Technical Manual

PowerPlex® ESX 17 System

GEBRAUCHSANLEITUNG FÜR DIE PRODUKTE DC6720 UND DC6721.

www.promega.com

Aktualisiert 7/12

Bestellnummer TMD024

PowerPlex® ESX 17 System

Unsere gesamte technische Fachliteratur ist im Internet unter www.promega.com/tbs/ zu finden. Um zu gewährleisten, dass Sie die aktuelle Version dieses Technischen Handbuchs verwenden, besuchen Sie bitte unsere Website. Bitte wenden Sie sich an den Technischen Kundendienst von Promega, wenn Sie Fragen bezüglich der Verwendung dieses Systems haben. E-Mail: genetic@promega.com

1. Beschreibung 2

2. Produktkomponenten und Lagerbedingungen 3

3. Bevor Sie beginnen 5
- A. Warnhinweise 5
- B. Matrixerstellung oder Spektralkalibrierung 6

4. Protokolle für die DNA Amplifikation mit dem PowerPlex® ESX 17 System 6
- A. Amplifikation - Setup 7
- B. Amplifikation - Thermocycling 9

5. Instrumenten-Setup und Probenvorbereitung 10
- A. Detektion amplifizierter Fragmente mit dem Applied Biosystems 3500 und 3500xL Genetic Analyzer 10
- B. Detektion amplifizierter Fragmente mit dem ABI PRISM® 3100 oder 3100-*Avant* Genetic Analyzer mit Data Collection Software, Version 2.0, und dem Applied Biosystems 3130 oder 3130*xl* Genetic Analyzer mit Data Collection Software, Version 3.0 21
- C. Detektion amplifizierter Fragmente mit dem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer 24

6. Datenanalyse 26
- A. PowerPlex® ESX Panel, Bin und Stutter Sets mit GeneMapper® *ID*-X Software, Version 1.2 26
- B. Erstellen eines Längenstandards mit GeneMapper® *ID*-X Software, Version 1.2 27
- C. Importieren des CC5 ILS 500 IDX Längenstandards in die GeneMapper® *ID*-X Software, Version 1.2 29
- D. Erstellen einer Methode zur Spurenanalyse mit GeneMapper® *ID*-X Software, Version 1.2 29
- E. Erstellen einer Methode zur Datenbank- oder Vaterschaftstest-Analyse mit GeneMapper® *ID*-X Software, Version 1.2 33
- F. PowerPlex® ESX Panels und Bin Sets mit GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2 36
- G. Erstellen eines Längenstandards mit GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2 37
- H. Importieren des CC5 ILS 500 Längenstandards in die GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2 39
- I. Erstellen einer Methode zur Spurenanalyse mit GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2 39
- J. Erstellen einer Methode zur Datenbank- oder Vaterschaftstest-Analyse mit GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2 42
- K. Probenanalyse mit GeneScan® Software und Windows®-Betriebssystemen 44
- L. Probenanalyse mit GeneScan® Software und Macintosh® Betriebssystemen 47
- M. Probenanalyse mit Genotyper® Software und PowerTyper™ ESX 17 Macro 48

N. Kontrollen....51
O. Ergebnisse....52

7. Fehlerbehebung....56
A. Amplifikation und Fragmentdetektion....56
B. Gene Mapper® *ID*-X Analyse-Software....59
C. GeneMapper® *ID* Analyse-Software....61
D. PowerTyper™ ESX 17 Macro....64

8. Literaturangaben....66

9. Anhang....67
A. Vorteile der Verwendung der Loci im PowerPlex® ESX 17 System....67
B. Methoden zur DNA-Extraktion und Quantifizierung....70
C. Der CC5 Internal Lane Standard 500....71
D. Vorbereiten des PowerPlex® ESX 17 System PCR Amplification Mix....72
E. Zusammensetzung von Puffern und Lösungen....72
F. Verwandte Produkte....73

1. Beschreibung

STR (Short Tandem Repeat) Loci bestehen aus kurzen, repetitiven Sequenzelementen mit Längen von 3–7 Basenpaaren (1–4). Diese Repeats sind überall im menschlichen Genom verteilt und hochgradig polymorphe Marker, die mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (5–9) nachgewiesen werden können. Allele von STR-Loci werden anhand der Kopienanzahl der Repeatsequenz differenziert, die in der amplifizierten Region enthalten sind, und nach einer elektrophoretischen Trennung mittels Fluoreszenzdetektion voneinander unterschieden.

Das PowerPlex® ESX 17 System[a–h] ermöglicht die Co-Amplifikation und vierfarbige Fluoreszenzdetektion von siebzehn Loci (sechzehn STR-Loci und Amelogenin), einschließlich D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, Amelogenin, D16S539, D2S1338, D1S1656, D10S1248, FGA, D8S1179, vWA, D22S1045, SE33, D19S433, D12S391 und D2S441.

Das PowerPlex® ESX 17 System ist mit den ABI PRISM® 310, 3100 und 3100-*Avan*t Genetic Analyzers und Applied Biosystems 3130, 3130*xl*, 3500 und 3500xL Genetic Analyzers kompatibel. Die Instrumente zur Amplifikation und Detektion können variieren. Unter Umständen müssen die Protokolle, einschließlich der Anzahl der Zyklen und Injektionszeit, für jedes Laborinstrument optimiert werden. Führen Sie eine laborinterne Validierung durch.

Das PowerPlex® ESX 17 System stellt alle Materialien bereit, die zur Amplifikation von STR-Regionen gereinigter genomischer DNA erforderlich sind, einschließlich Hot Start *Taq* DNA Polymerase. Diese ist im PowerPlex® ESX 5X Master Mix enthalten. Dieses Handbuch enthält separate Protokolle für den Einsatz des PowerPlex® ESX 17 Systems mit den GeneAmp® PCR System 9700 und 2720 Thermocyclern und zusätzlich Protokolle für das Auftrennen amplifizierter Produkte und deren Detektion (Abbildung 1). Protokolle für den Betrieb des Fluoreszenzdetektionsinstruments können vom Hersteller des Instruments angefordert werden.

Informationen über andere STR Fluoreszenz-Systeme von Promega sind auf Anfrage bei Promega unter: **www.promega.com** erhältlich.

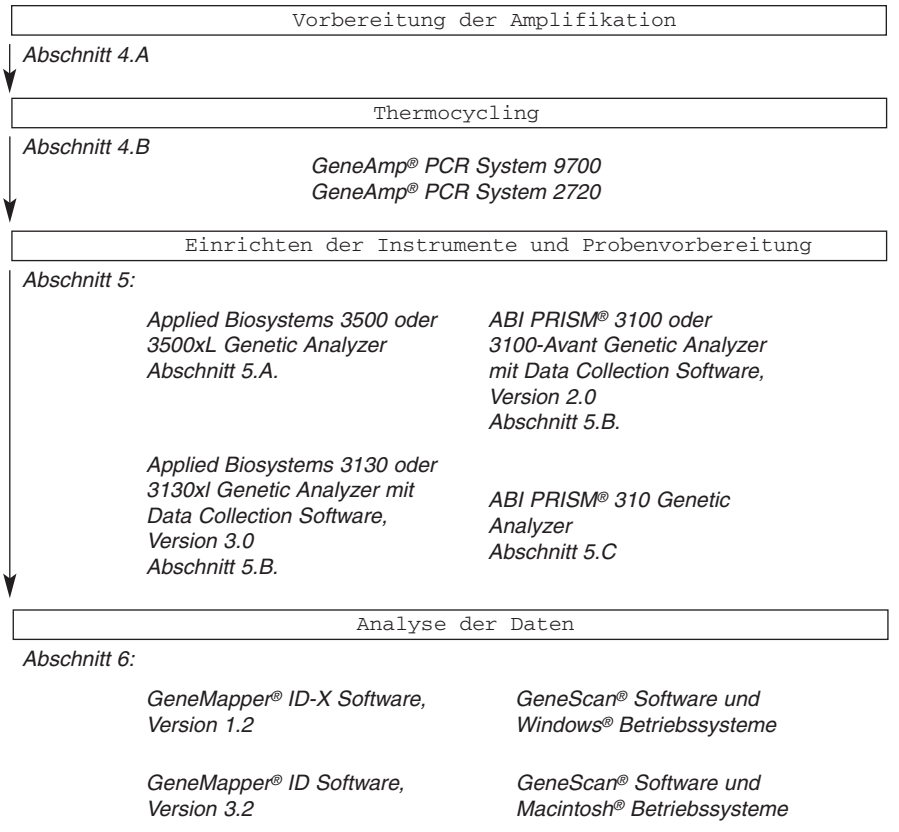
Vorbereitung der Amplifikation
Abschnitt 4.A
Thermocycling
Abschnitt 4.B
GeneAmp® PCR System 9700
GeneAmp® PCR System 2720
Einrichten der Instrumente und Probenvorbereitung
Abschnitt 5:
Applied Biosystems 3500 oder 3500xL Genetic Analyzer Abschnitt 5.A.
ABI PRISM® 3100 oder 3100-Avant Genetic Analyzer mit Data Collection Software, Version 2.0 Abschnitt 5.B.
Applied Biosystems 3130 oder 3130xl Genetic Analyzer mit Data Collection Software, Version 3.0 Abschnitt 5.B.
ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer Abschnitt 5.C
Analyse der Daten
Abschnitt 6:
GeneMapper® ID-X Software, Version 1.2
GeneScan® Software und Windows® Betriebssysteme
GeneMapper® ID Software, Version 3.2
GeneScan® Software und Macintosh® Betriebssysteme

Abbildung 1. Übersicht über das Protokoll für das PowerPlex® ESX 17 System.

2. Produktkomponenten und Lagerbedingungen

Produkt	Größe	Bestellnummer
PowerPlex® ESX 17 System	100 Reaktionen	DC6721

Nicht für die medizinische Diagnostik. Die in diesem System enthaltenen Reagenzien reichen für 100 Reaktionen von je 25 µl aus. Lieferumfang:

Box mit Komponenten für die Prä-Amplifikation (blaues Etikett)

500 µl	PowerPlex® ESX 5X Master Mix
250 µl	PowerPlex® ESX 17 10X Primer Pair
250 ng	9947A DNA, 10 ng/µl
5 × 1 250 µl	Wasser, Amplifikationsgüte

Box mit Komponenten für die Post-Amplifikation (beiges Etikett)

50 µl	PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix
300 µl	CC5 Internal Lane Standard 500

2. Produktkomponenten und Lagerbedingungen (Fortsetzung)

Produkt	Größe	Bestellnummer
PowerPlex® ESX 17 System	400 Reaktionen	DC6720

Nicht für die medizinische Diagnostik. Die in diesem System enthaltenen Reagenzien reichen für 400 Reaktionen von je 25 µl aus. Lieferumfang:

Box mit Komponenten für die Prä-Amplifikation (blaues Etikett)

4 × 500 µl	PowerPlex® ESX 5X Master Mix
4 × 250 µl	PowerPlex® ESX 17 10X Primer Pair
250 ng	9947A DNA, 10 ng/µl
10 × 1 250 µl	Wasser, Amplifikationsgüte

Box mit Komponenten für die Post-Amplifikation (beiges Etikett)

4 × 50 µl	PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix
4 × 300 µl	CC5 Internal Lane Standard 500

Der PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix wird in einem separaten, dicht verschlossenen Beutel geliefert. Geben Sie diese Komponente nach dem Öffnen in die Box für die Post-Amplifikation. Das Wasser, Amplifikationsgüte, wird in einem separaten, dicht verschlossenen Beutel geliefert. Geben Sie diese Komponente nach dem Öffnen in die Box für die Prä-Amplifikation.

Lagerungsbedingungen: Bewahren Sie alle Komponenten bei –20 °C in einem nicht entfrostenden Gefrierschrank auf. Die 9947A DNA und Wasser, Amplifikationsgüte, können langfristig bei 4 °C gelagert werden. Der PowerPlex® ESX 17 10X Primer Pair Mix, der PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix und der CC5 Internal Lane Standard 500 (CC5 ILS 500) sind lichtempfindlich und müssen lichtgeschützt gelagert werden. Wir empfehlen dringend, die Reagenzien für die Prä-Amplifikation und die Reagenzien für die Post-Amplifikation separat zu lagern und getrennt mit verschiedenen Pipetten, Röhrchenhalter usw. zu verwenden. Für den täglichen Gebrauch können der PowerPlex® ESX 17 10X Primer Pair Mix und der PowerPlex® ESX 5X Master Mix ohne Aktivitätsverlust bis zu einem Monat bei 4° C aufbewahrt werden.

Separat erhältlich

Die korrekten Panel und Bin Dateien für die GeneMapper® *ID* und *ID*-X Software können hier heruntergeladen werden:
www.promega.com/geneticidtools/panels_bins/. Die PowerTyper™ ESX Macros können hier heruntergeladen werden:
www.promega.com/geneticidtools/powertyper/

Für die Erstellung der Farbseperationsmatrix sind Matrix-Standards erforderlich. Die Matrix-Standards sind separat und sowohl für ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 310, Bestellnummer DG4600) und ABI PRISM® 3100 und 3100-*Avant* Genetic Analyzers sowie Applied Biosystems 3130, 3130*xl*, 3500 und 3500xL Genetic Analyzers (PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 3100/3130, Bestellnummer DG4700) erhältlich.

3. Bevor Sie beginnen

3.A. Warnhinweise

Bei der Typisierungen auf PCR-Basis für die Spurenanalyse oder Vaterschaftstests müssen Validierungsstudien und Qualitätskontrollmaßnahmen durchgeführt werden, die in diesem Handbuch nicht enthalten sind (10,11). Richtlinien für den Validierungsprozess sind im *Internal Validation of STR Systems Reference Manual* (12) veröffentlicht.

Die Qualität der aufgereinigten DNA, sowie geringe Veränderungen der Puffer, der Ionenkonzentrationen, der Primerkonzentrationen, der Wahl des Thermocyclers und den Bedingungen während des Thermocyclings können den Erfolg der PCR beeinflussen. Wir legen nahe, die empfohlenen Verfahren zur Amplifikation und Fluoreszenzdetektion genau zu befolgen. Sollten an den empfohlenen Protokollen Änderungen vorgenommen werden, sind zusätzliche Recherchen und Validierungen erforderlich.

Bei der STR-Analyse auf PCR-Basis kann Kontamination durch geringste Mengen menschlicher DNA auftreten. Es muss äußerst sorgfältig gearbeitet werden, um Kreuzkontamination bei der Vorbereitung der Proben-DNA, der Handhabung von Primerpaaren, dem Zusammenstellen von Amplifikationsreaktionen und der Analyse der Amplifikationsprodukte zu vermeiden. Reagenzien und Materialien, die vor der Amplifikation verwendet werden (PowerPlex® ESX 5X Master Mix, PowerPlex® ESX 17 10X Primer Pair Mix, 9947A DNA und Wasser, Amplifikationgüte) werden in einer getrennten Box bereitgestellt und sind getrennt von den Materialien zu lagern, die nach der Amplifkation eingesetzt werden (PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix und CC5 Internal Lane Standard 500). Zur Feststellung einer eventuellen Kontamination der Reagenzien muss immer eine Negativkontrollreaktion (d. h. ohne Zugabe von DNA) durchgeführt werden. Wir empfehlen dringlich, Handschuhe und gegen Aerosol geschützte Pipettenspitzen (z. B. ART® tips, Abschnitt 9.F) zu verwenden.

Manche der in der Analyse von STR-Produkten verwendeten Reagenzien sind potenziell gefährlich und müssen entsprechend gehandhabt werden. Formamid ist ein Reizmittel und ein Teratogen. Vermeiden Sie das Einatmen und Kontakt mit der Haut. Lesen Sie vor dem Handhaben dieser Substanz das Warnetikett durch und treffen Sie entsprechende Vorsichtsmaßnahmen. Tragen Sie beim Handhaben von Formamid immer Handschuhe und eine Schutzbrille.

3.B. Matrixerstellung oder Spektralkalibrierung

Um mit den ABI PRISM® 310, 3100 und 3100-*Avant* Genetic Analyzers und Applied Biosystems 3130, 3130*xl*, 3500 und 3500xL Genetic Analyzers mehrfarbige Systeme auswerten zu können, ist das korrekte Erstellen einer Matrixdatei erforderlich. Für jedes einzelne Instrument muss eine Matrix erstellt werden.

Für die Matrixerstellung auf dem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer werden die PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 310 (Bestellnummer DG4600) benötigt. Die PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards 3100/3130 (Bestellnummer DG4700) können nicht dazu verwendet werden, eine Matrix auf dem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer zu erstellen.

Für die Spektralkalibrierung auf den ABI PRISM® 3100 und 3100-*Avan*t Genetic Analyzers und Applied Biosystems 3130, 3130*xl*, 3500 und 3500xL Genetic Analyzers werden die PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 3100/3130 benötigt. Die PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards 310 können nicht dazu verwendet werden, eine Matrix auf diesen Instrumenten zu erstellen.

Protokolle und zusätzliche Informationen über die Matrixerstellung können Sie dem *technischen Datenblatt PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 310,* Bestellnummer TBD023 entnehmen. Protokolle und zusätzliche Informationen über die Matrixerstellung können Sie dem *technischen Datenblatt PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 3100/3130,* Bestellnummer TBD024, entnehmen. Diese Handbücher sind auf Anfrage bei Promega oder im Internet unter **www.promega.com/tbs/** verfügbar.

4. Protokolle für die DNA-Amplifikation mit dem PowerPlex® ESX 17 System

Vom Anwender bereitzustellende Materialien

- GeneAmp® PCR System 9700 oder 2720 Thermocycler (Applied Biosystems)
- Mikrozentrifuge
- 0,2 ml MicroAmp® Reaktionsröhrchen oder MicroAmp® Optical 96-Well Reaktionsplatte (Applied Biosystems)
- 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen
- Gegen Aerosol geschützte Pipettenspitzen (siehe Abschnitt 9.F)

Wir amplifizieren routinemäßig 0,5 ng Template-DNA in einem Reaktionsvolumen von 25 µl, wobei die unten ausgeführten Protokolle befolgt werden. Das PowerPlex® ESX 17 System ist für den GeneAmp® PCR System 9700 Thermocycler optimiert. Ein Amplifikationsprotokoll für den GeneAmp® PCR Systems 2720 Thermocycler ist in diesem Handbuch enthalten.

4.A. Amplifikation - Setup

Um Kreuzkontamination zu vermeiden, wird die Verwendung von Handschuhen und gegen Aerosol geschützte Pipettenspitzen dringend empfohlen. Lagern Sie alle Reagenzien für die Prä-Amplifikation und die Post-Amplifikation in separaten Räumen. Bereiten Sie die Amplifikationsreaktionen in einem Raum vor, der speziell für die Reaktionsvorbereitung vorgesehen ist. Verwenden Sie Geräte und Verbrauchsmaterialien, die nur der Amplifikationsvorbereitung dienen.

Die Konzentration der 9947A DNA wurde durch Absorptions-Messungen bei 260 nm ermittelt. Die Quantifizierung mit anderen Methoden, wie qPCR, kann zu abweichenden Ergebnissen führen. Stellen Sie für jedes Amplifikations-Set eine frische DNA-Verdünnung her. Bewahren Sie diese verdünnte DNA nicht auf.

Die Zelllinien-DNA 9947A zeigt allelische Imbalance und Imbalance zwischen STR-Loci an. **Für Sensitivitätstests darf keine Zelllinien-DNA verwendet werden.** DNA, die für Sensitivitätsstudien verwendet wird, ist vor dem Gebrauch bei 4 °C über Nacht zu lagern. Bewahren Sie keine verdünnte DNA (z. B. 0,25 ng/µl oder darunter) auf. Für jeden neuen Amplifikationsansatz muss eine frische DNA-Verdünnung hergestellt werden.

Damit die Amplifikation erfolgreich ist, muss mit äußerster Sorgfalt gearbeitet werden. Richtlinien zur Problemlösung bei der Amplifikation sind in Abschnitt 7.A enthalten.

1. Tauen Sie den PowerPlex® ESX 5X Master Mix, PowerPlex® ESX 17 10X Primer Pair Mix, die 9947A DNA und Wasser, Amplifikationsgüte, vollständig auf.

   Hinweis: Zentrifugieren Sie die Röhrchen kurz, damit sich der Inhalt am Boden sammelt. Vortexen Sie dann die Reagenzien vor jedem Gebrauch 15 Sekunden lang. Der 10X Primer Pair Mix darf nach dem Vortexen kein weiteres Mal zentrifugiert werden, da dies dazu führen kann, dass sich die Primer am Boden des Röhrchens konzentrieren.

2. Bestimmen Sie die Anzahl der Reaktionen, die angesetzt werden sollen. Dabei müssen sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrollen berücksichtigt werden. Zu dieser Anzahl werden 1 oder 2 Reaktionen hinzugefügt, um Pipettierfehler zu kompensieren. Dieses Verfahren verbraucht nur eine kleine Menge jedes Reagenz und gewährleistet aber dafür, dass genug PCR-Amplifikationsgemisch für alle Proben zur Verfügung steht. Es stellt zudem sicher, dass jede Reaktion das gleiche PCR-Amplifikationsgemisch enthält.

3. Stellen Sie für jede Reaktion ein sauberes 0,2 ml Reaktionsröhrchen in einen Halter und versehen Sie es mit einer geeigneten Beschriftung. Alternativ dazu kann eine MicroAmp® Platte verwendet und auf geeignete Weise beschriftet werden.

4.A. Amplifikation - Setup (Fortsetzung)

4. Geben Sie das endgültige Volumen von jedem in Tabelle 1 aufgelisteten Reagenz in ein steriles 1,5 ml Röhrchen.

   Tabelle 1 zeigt das Volumen jeder Komponente pro Reaktion an. Ein Arbeitsblatt zur Berechnung der erforderlichen Menge jeder Komponente des PCR-Amplifikationsgemisches befindet sich in Abschnitt 9.D (Tabelle 5).

Tabelle 1. PCR Amplifikationsgemisch für das PowerPlex® ESX 17 System.

Komponente des PCR Amplifikationsgemisch[1]	Volumen pro Reaktion
Wasser, Amplifikationsgüte	bis zu einem endgültigen Volumen von 25,0 µl
PowerPlex® ESX 5X Master Mix	5,0 µl
PowerPlex® ESX 17 10X Primer Pair Mix	2,5 µl
Template-DNA (0,5 ng)[2,3]	bis zu 17,5 µl
Gesamtreaktionsvolumen	**25 µl**

[1] Zuerst Wasser, Amplifikationsgüte, in das Röhrchen füllen, dann PowerPlex® ESX 5X Master Mix und PowerPlex® ESX 17 10X Primer Pair Mix hinzufügen. Die Template-DNA wird in Schritt 6 hinzugefügt.

[2] DNA-Template in nukleasefreiem Wasser oder TE^{-4} Puffer lagern (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 0,1 mM EDTA). Wenn das DNA-Template in TE-Puffer gelagert wird, der nicht den pH-Wert 8,0 hat oder eine höhere EDTA-Konzentration enthält, darf das hinzugefügte DNA-Volumen 20 % des endgültigen Reaktionsvolumens nicht überschreiten. Die Effizienz und Qualität der PCR-Amplifikation kann durch eine Veränderung des pH-Werts (aufgrund von hinzugefügtem Tris-HCl), der Magnesiumkonzentration (aufgrund von Chelatbildung durch EDTA) oder der Anwesenheit von PCR-Inhibitoren stark beeinflusst werden. PCR-Inhibitoren können, abhängig vom DNA-Ausgangmaterial und dem verwendeten Extraktionsverfahren, in geringen Konzentrationen vorhanden sein.

[3] DNA-Konzentrationen können je nach verwendetem DNA-Quantifizierungsverfahren, variieren (13). Die hier empfohlene Menge an DNA-Template basiert auf Messungen der DNA-Konzentration bei einer Absorption von 260 nm. Wir empfehlen dringlich, eigene Versuche durchzuführen, um die optimale DNA-Menge für die verwendete DNA-Quantifizierungsmethode zu bestimmen.

5. Vortexen Sie das PCR-Amplifikationsgemisch 5–10 Sekunden lang bevor Sie es in die einzelnen Reaktionsröhrchen pipettieren.

! Ein unzureichendes Vortexen des PCR-Amplifikationsgemisches kann zu schlechter Amplifikation oder Imbalance von Locus zu Locus führen.

6. Geben Sie die Template-DNA (0,5 ng) für jede Probe in das entsprechende Röhrchen mit dem PCR-Amplifikationsgemisch.
7. Verdünnen Sie für die positive Amplifikationskontrolle die 9947A DNA auf 1,0 ng im gewünschten Template-DNA Volumen. Geben Sie 1,0 ng der verdünnten DNA in ein Reaktionsröhrchen mit PCR-Amplifikationsgemisch.

8. Für die negative Amplifikationskontrolle wird Wasser, Amplifikationsgüte (anstelle der Template-DNA), in ein Reaktionsröhrchen mit PCR-Amplifikationsgemisch pipettiert.

4.B. Amplifikation - Thermocycling

Dieses Handbuch enthält Protokolle für den Gebrauch des PowerPlex® ESX 17 System mit den GeneAmp® PCR System 9700 und 2720 Thermocyclern.

Die Instrumente zur Amplifikation und Detektion können variieren. Unter Umständen müssen die Protokolle, einschließlich der Anzahl der Zyklen und Injektionszeit, für jedes Laborinstrument optimiert werden. Von der Promega Corporation durchgeführte Tests haben gezeigt, dass für 0,5 ng DNA-Template 30 Zyklen zu guten Erfolgen führen.

1. Stellen Sie die Röhrchen oder MicroAmp® Platte in den Thermocycler.
2. Wählen Sie das empfohlene Protokoll aus und starten Sie es. Das bevorzugte Protokoll für die GeneAmp® PCR System 9700 und 2720 Thermocycler ist unten aufgeführt.

Protokoll zum Thermocycling[1]
96 °C für 2 Minuten, dann:
94 °C für 30 Sekunden 59 °C für 2 Minuten 72 °C für 90 Sekunden für 30 Zyklen, dann:
60 °C für 45 Minuten
bei 4 °C einweichen

[1] Wenn der GeneAmp® PCR System 9700 Thermocycler verwendet wird, muss das Programm mit 9600 als Ramp Speed betrieben werden. Die Ramp Speed wird eingestellt, nachdem der Lauf des Thermocyclers begonnen hat. Der Bildschirm „Select Method Options“ wird angezeigt. Wählen Sie „9600“ als Ramp Speed und geben Sie das Reaktionsvolumen ein.

3. Bewahren Sie nach Beendigung des Thermocycling-Protokolls die Proben bei –20 °C in einem lichtgeschützten Behälter auf.

Hinweis: Wenn amplifizierte Proben langfristig bei 4 °C oder darüber gelagert werden, können Zerfallsprodukte entstehen.

5. Instrumenten-Setup und Probenvorbereitung

5.A. Detektion amplifizierter Fragmente mit dem Applied Biosystems 3500 und 3500xL Genetic Analyzer

Vom Anwender bereitzustellende Materialien

- 95 °C Heizblock, Wasserbad oder Thermocycler
- zerstoßenes Eis oder Eiswasserbad
- Zentrifuge, kompatibel mit 96-well-Platten
- gegen Aerosol geschützte Pipettenspitzen
- 3500 oder 3500xL Kapillaren-Array, 36 cm
- 96-well Retainer und Base Set (Standard) (Applied Biosystems Cat.# 4410228)
- POP-4™ Polymer für den Applied Biosystems 3500 und 3500xL Genetic Analyzer
- Behälter für den Anoden-Puffer
- Behälter für den Kathoden-Puffer
- Conditioning Reagent für den Applied Biosystems 3500 und 3500xL Genetic Analyzer
- MicroAmp® Optical 96-Well Plate und Septen
- Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems Bestellnummer 4311320)
- PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 3100/3130 (Bestellnummer DG4700)

Die Qualität des Formamids ist von wesentlicher Bedeutung. Verwenden Sie Hi-Di™ Formamid und aliquotieren Sie das Formamid bevor Sie es bei –20 °C einfrieren. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen oder längerfristige Lagerung bei 4 °C kann den Zerfall des Formamids bewirken. Formamid von schlechter Qualität kann Ionen enthalten, die während der Injektion mit der DNA konkurrieren, und somit zu geringeren Peak-Höhen und reduzierter Sensitivität führen. Eine längere Injektionszeit verstärkt das Signal dann nicht unbedingt.

Formamid ist ein Reizmittel und ein Teratogen. Vermeiden Sie das Einatmen und Kontakt mit der Haut. Lesen Sie vor dem Einsatz dieser Substanz das Warnetikett durch und treffen Sie entsprechende Vorsichtsmaßnahmen. Tragen Sie beim Einsatz von Formamid immer Handschuhe und eine Schutzbrille.

Vorbereitung der Proben

1. Der Ladecocktail wird vorbereitet, indem CC5 Internal Lane Standard 500 und Hi-Di™ Formamid folgendermaßen gemischt werden:

   [(1,0 µl CC5 ILS 500) × (Anzahl der Injektionen)] + [(10,0 µl Hi-Di™ Formamid) × (Anzahl der Injektionen)]

   Hinweis: Das Volumen des internen Längenstandards im Ladecocktail kann verdoppelt werden, um die Intensität der Standard-Peaks anzupassen. Belassen Sie das Volumen des Formamids bei 10,0 µl und passen Sie das Volumen, das in Schritt 3 in die Wells gegeben wird, entsprechend an.

2. Vortexen Sie 10–15 Sekunden lang.

3. Pipettieren Sie 11 µl des Gemisches von Formamid und internem Längenstandard in jedes Well.

4. Geben Sie 1 µl der amplifizierten Probe (oder 1 µl PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix) zu. Decken Sie die Wells mit den geeigneten Septen ab.

   Hinweis: Die Detektionsgrenzen verschiedener Instrumente sind unterschiedlich, daher müssen die Injektionszeit, Injektionsspannung oder die Menge des PCR-Produkts eventuell angepasst werden. Die Injektionszeit und die Injektionsspannung können Sie im Run-Module des Module Manager in der Data Collection Software ändern (siehe unten: Vorbereitung des Instruments). Sind die Peakhöhen zu hoch, setzen Sie weniger DNA -Template in den Amplifikationsreaktionen ein oder reduzieren Sie die Anzahl der Zyklen um 2 bis 4 Zyklen im Amplifikationsprogramm.

5. Zentrifugieren Sie die Platte kurz an, damit eventuelle Luftblasen aus den Wells entfernt werden.

6. Denaturieren Sie die Proben bei 95 °C 3 Minuten lang und kühlen Sie sie dann sofort danach auf zerstoßenem Eis oder in einem Eiswasserbad 3 Minuten lang ab.

5.A. Detektion amplifizierter Fragmente mit dem Applied Biosystems 3500 und 3500xL Genetic Analyzer (Fortsetzung)

Vorbereiten des Instruments

Anleitungen zum Reinigen des Pumpenblocks, Installieren der Kapillaren, Kalibrieren des Autosamplers und Einfüllen von Polymer in die Spritze sind im Handbuch für den Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analzyer zu finden. Analysieren Sie die Proben gemäß der Beschreibung im Benutzerhandbuch für den Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analzyer.

1. Öffnen Sie die 3500 Data Collection Software. Der Dashboard Screen öffnet sich (Abbildung 2). Stellen Sie sicher, dass die „Consumables Information" und die „Maintenance Notifications" richtig eingestellt sind.

   Stellen Sie die Ofen-Temperatur auf 60°C, wählen Sie dann „Start Pre-Heat" mindestens 30 Minuten bevor Sie die erste Injektion machen, um den Ofen aufzuheizen.

3500 Data Collection Software
Library Maintenance Tools Manage Preferences Help Log Out
Common Operations
Quick Start Run
Create New Plate
Create Plate from Template
Edit Existing Plate
View Run Results
Maintain Instrument
Quick View
Gauges
POP4 Polymer
ABC - (Anode)
CBC - (Cathode)
36cm - 24 cap Array
48 Samples Remaining (6 Injections Remaining)
7 Days Remaining (46 Injections Remaining)
7 Days Remaining (46 Injections Remaining)
66 Injections Performed
Instrument: 3500 Instrument
Laser: On
EP: Off
State: Idle
Oven: On
Oven Door: Close
Instrument Door: Close
View Instrument Sensor Details
Oven Temperature (°C): 60.0
Detection Cell Temperature (°C): 49.96
Pre-Heat the Oven
Set Temperature to:
60 (°C) Start Pre-Heat
Consumables Information
Refresh
Consumable Name Status Days on Instrument Expiration Date Lot Number Part Number
Polymer POP4 48 Samples Remaining 5 06-Jan-2011 06... 1006009 4393715
Anode Buffer ABC 7 Days Remaining 0 18-Mar-2011 07... 1006014 4393927
Cathode Buffer CBC 7 Days Remaining 0 23-Mar-2011 07... 1007021 4408256
Capillary Array 36cm - 24 cap 94 Injections Remaining 51 03-Feb-2011 02... 08 4404687 - Serial # M309K0803
Maintenance Notifications
Name Priority Notification Date Description Action
92477A

Abbildung 2. Der Dashboard Screen.

2. Um ein neues Protokoll anzulegen, wählen Sie aus der Library, das „Instrument Protocol" und wählen dann „Create". Alternativ können Sie ein bereits angelegtes Protokoll nutzen.

   Abbildung 3 zeigt die Einstellungen die Promega beim Applied Biosystems 3500xL für Applikationstyp, Dye Set, Kapillarlänge, Polymer, Run Module und entsprechende Protokollinformationen einsetzt. Die einzige Einstellung, die vom Standard abweicht ist das Dye Set.

   Wenn Sie ein neues Instrument Protocol anlegen, stellen Sie sicher, dass dasselbe Dye Set für die Kalibration der Promega 5-Dye Matrix benutzt wurde. Wir empfehlen eine Laufzeit von 1 210 Sekunden und die Standardeinstellungen für die Injektion.

Optimieren und validieren Sie Laufzeit und andere Geräteeinstellungen in Ihrem Labor.

Geben Sie dem Protokoll einen eingängigen Namen.

Hinweis: Nähere Informationen finden Sie im *Handbuch des Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers*.

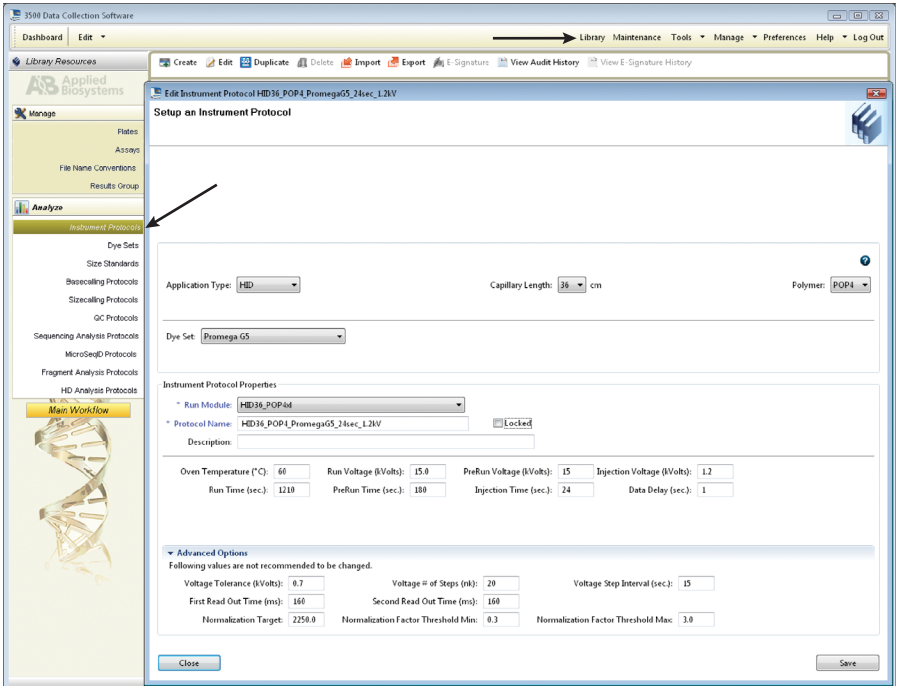

Abbildung 3. Das Fenster „Create New Instrument Protocol".

5.A. Detektion amplifizierter Fragmente mit dem Applied Biosystems 3500 und 3500xL Genetic Analyzer (Fortsetzung)

3. Erstellen Sie in der Library einen neuen Größenstandard für das QC Protokoll. Wählen Sie „Size Standard", dann „Create". Alternativ können Sie einen vorher erstellten Längenstandard nutzen.

   Geben Sie dem Größenstandard den Namen „PPlex_ILS500" oder einen anderen geeigneten Namen. Wählen Sie „Orange" als Dye Color. Die Fragmente im Längenstandard sind 60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 450, 475 und 500 Basen. Siehe Abbildung 4.

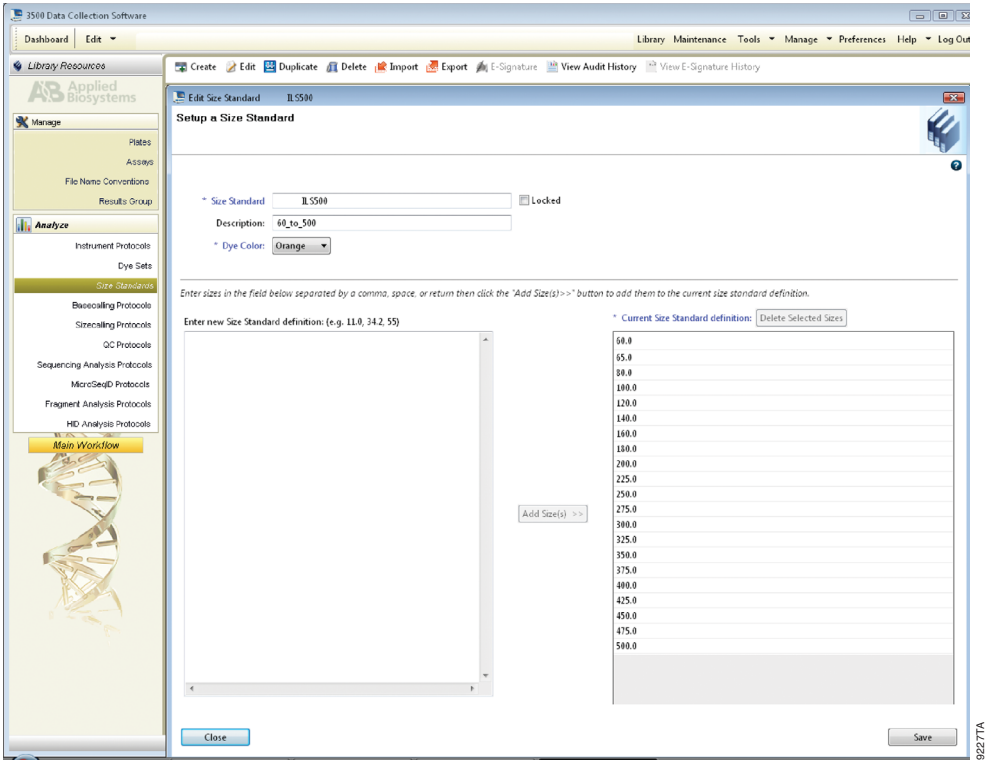

Abbildung 4. Das Fenster „Create New Size Standard".

4. Um ein neues QC Protokoll anzulegen, wählen Sie „QC Protocols" in der Library und dann „Create". Alternativ können Sie einen bereits erstelltes QC Protokoll nutzen.

   Geben Sie dem Protokoll einen eingängigen Namen. Wählen Sie den Längenstandard aus Schritt 3 aus. Die Einstellungen sollten auf Ihren internen Validierungsdaten für das PowerPlex® ESX 17 System auf dem Applied Biosystems 3500 oder 3500xL basieren. Abbildung 5 zeigt eine mögliche Einstellung.

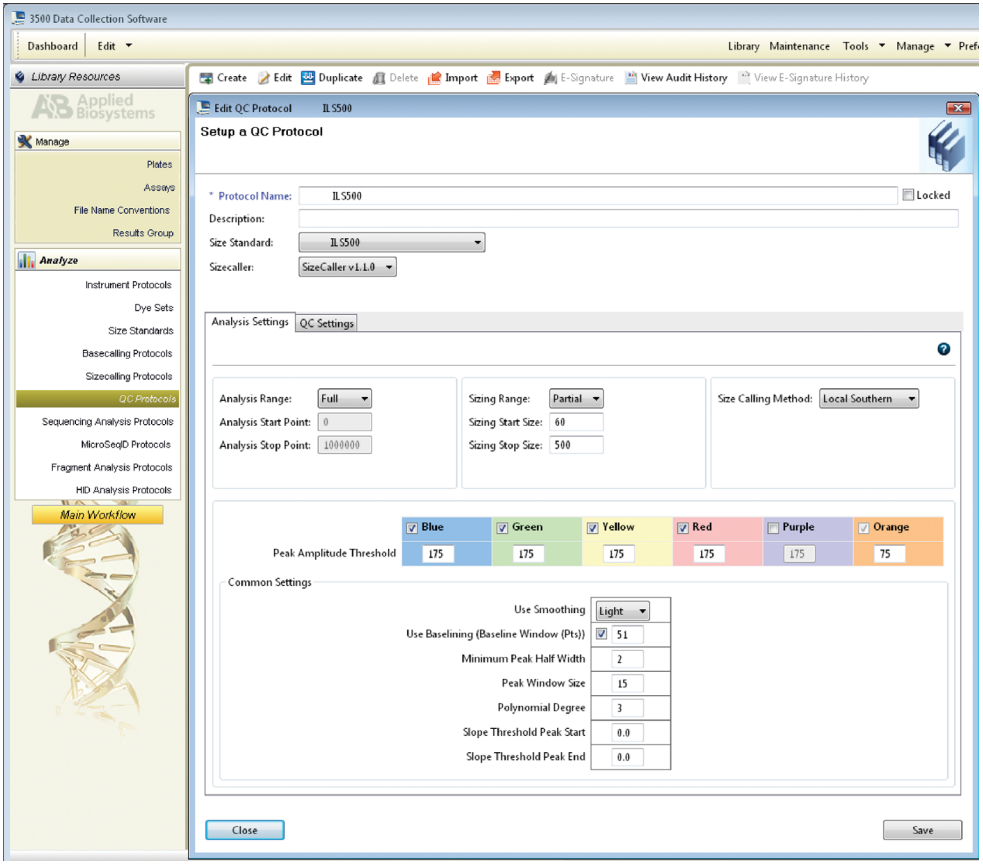

Abbildung 5. Das Fenster „Create New QC Protocol".

5.A. Detektion amplifizierter Fragmente mit dem Applied Biosystems 3500 und 3500xL Genetic Analyzer (Fortsetzung)

5. Um einen neuen Assay zu erstellen, navigieren Sie in die Library. Wählen Sie „Assays“, dann „Create“. Alternativ können Sie einen bereits angelegten Assay nutzen.

   Im „Create New Assay“ Fenster (Abbildung 6) wählen Sie das Geräteprotokoll aus Schritt 2 und das QC Protokoll, das in Schritt 4 erstellt wurde, aus. Vergeben Sie einen eingängigen Namen. Wählen als „Application Type“ „HID“. Ein Assay ist notwendig für alle benannten Proben auf einer Platte.

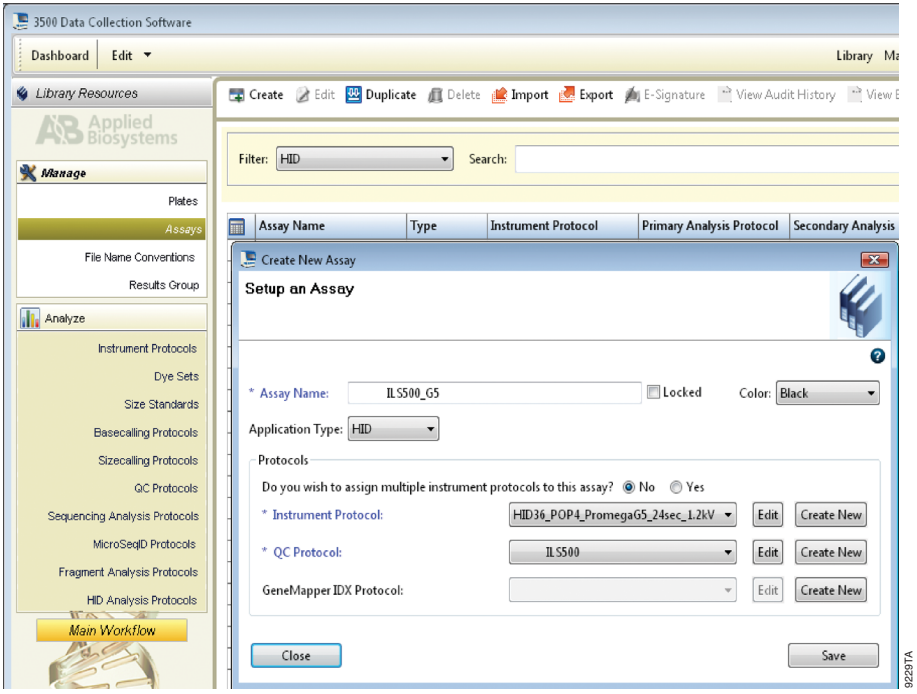

Abbildung 6. Das Fenster „Create New Assay“.

6. Um eine neue „File Name Convention“ anzulegen (Abbildung 7), navigieren Sie in die Library. Wählen Sie „File Name Convention“ und dann „Create“. Alternativ können Sie eine bereits bestehende „File Name Convention“ nutzen.

   Wählen Sie die „File Name Convention“ nach Ihren Laborgepflogenheiten und speichern Sie diese unter einem eingängigen Namen.

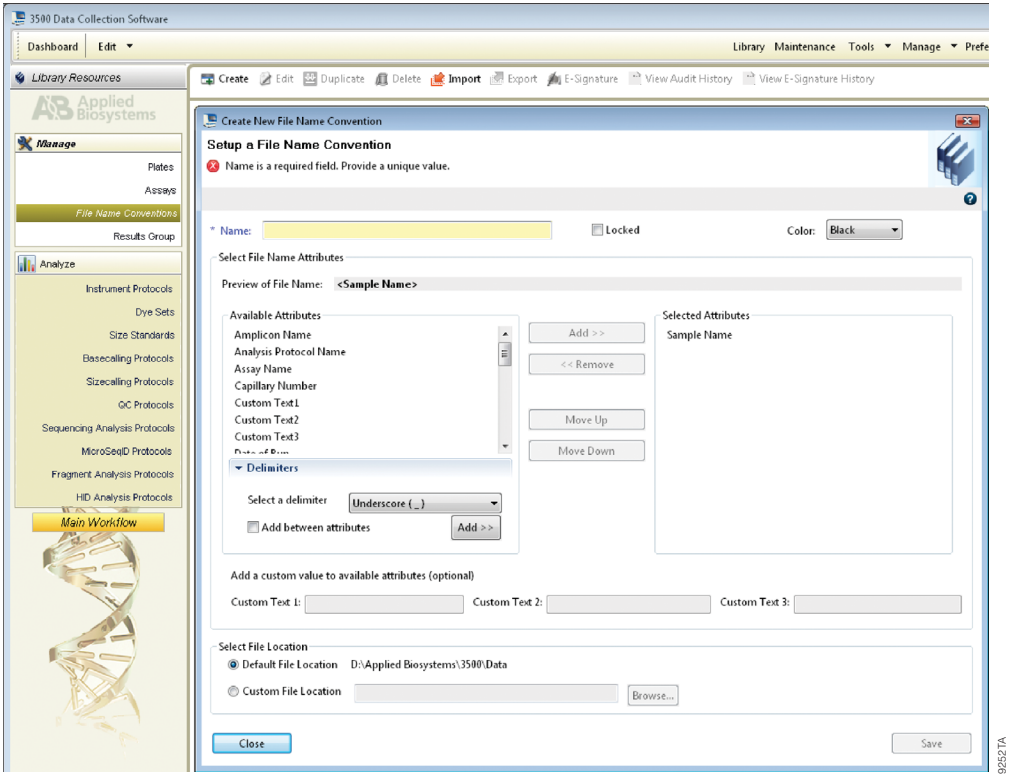

Abbildung 7. Das Fenster „New File Name Convention“.

5.A. Detektion amplifizierter Fragmente mit dem Applied Biosystems 3500 und 3500xL Genetic Analyzer (Fortsetzung)

7. Um eine neue „Result Group“ anzulegen (Abbildung 8), navigieren Sie in die Library. Wählen Sie „Result Group“ und dann „Create“. Alternativ können Sie eine bereits bestehende „Result Group“ nutzen.

   Wählen Sie die „Result Group“ nach Ihren Laborgepflogenheiten aus und speichern Sie diese unter einem eingängigen Namen.

8. Um eine neue Platte anzulegen, navigieren Sie in die Library und wählen Sie „Plates“ aus dem Manage Menü. Wählen Sie dann „Create“.

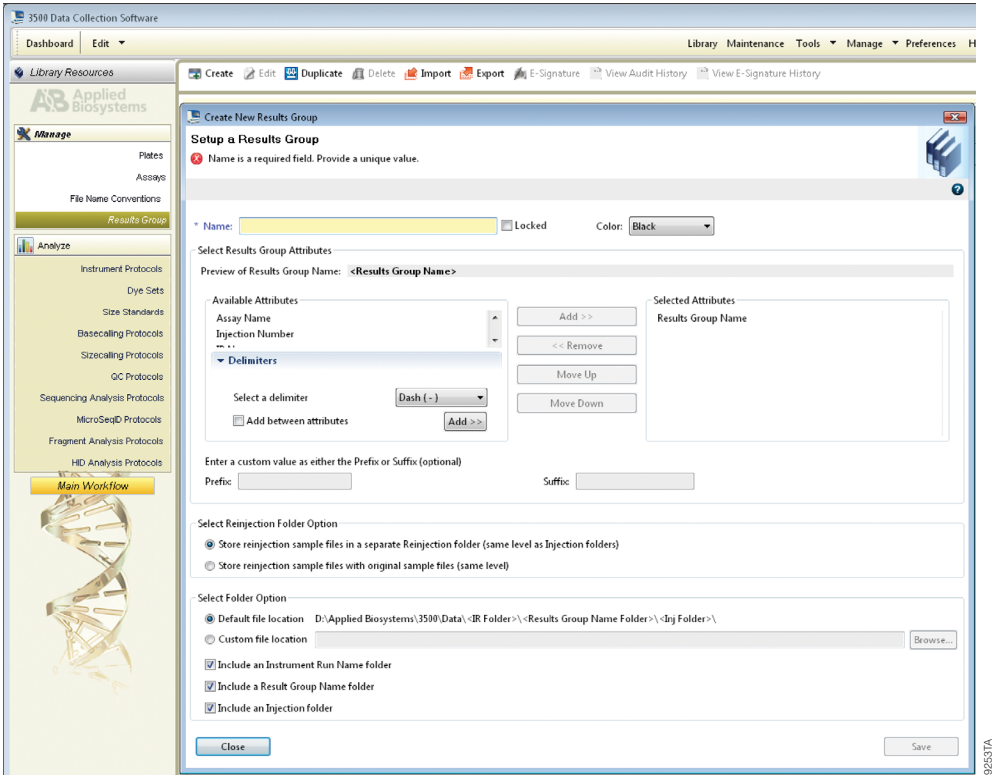

Abbildung 8. Das Fenster „New Result Group“.

9. Vergeben Sie einen eingängigen Plattennamen . Wählen Sie dann den Plattentyp „HID“ aus der Drop-Down-Liste aus (Abbildung 9).

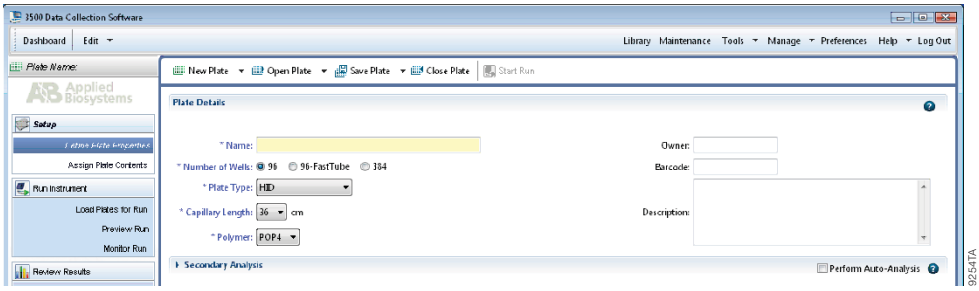

Abbildung 9. Die Auswahl der Platten-Eigenschaften.

10. Wählen Sie „Assign Plate Contents“ (Abbildung 10).
11. Vergeben Sie Probennamen für die Wells.
12. Im unteren linken Bereich des Bildschirms, unter „Assays“, wählen Sie mit der „Add from Library“ Option den Assay, den Sie im Schritt 5 erstellt haben, oder wählen Sie einen bereits bestehenden Assay aus. Klicken Sie auf den „Add to Plate“-Button und schließen Sie das Fenster.

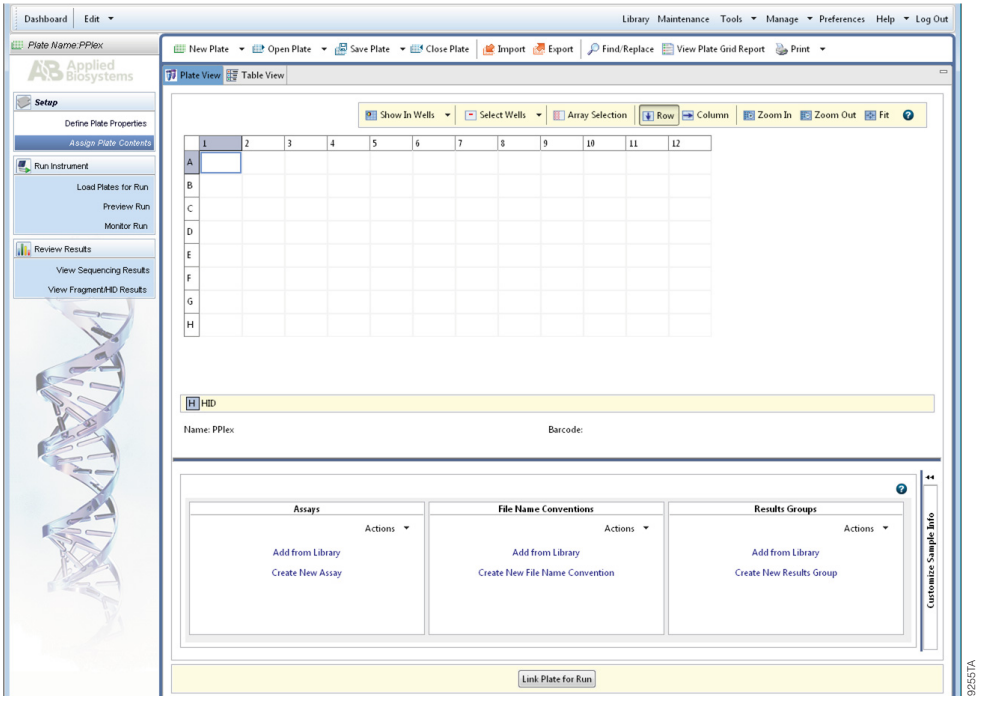

Abbildung 10. Namenvergabe auf der Platte.

5.A. Detektion amplifizierter Fragmente mit dem Applied Biosystems 3500 und 3500xL Genetic Analyzer (Fortsetzung)

13. Unter „File Name Convention“ wählen Sie mit der „Add from Library“ Option die File Name Convention aus, den Sie im Schritt 6 erstellt habenoder wählen einen bereits bestehendenden File Name Convention aus. Klicken Sie auf den „Add to Plate“-Button und schließen Sie das Fenster.
14. Unter „Result Groups“, wählen Sie mit der „Add from Library“ Option die Result Group aus, den Sie im Schritt 7 erstellt haben, oder wählen eine bereits bestehende Results Group aus. Klicken Sie auf den „Add to Plate“-Button und schließen Sie das Fenster.
15. Markieren Sie die Proben-Wells und wählen dann die zugehörigen Assays, File Name Conventions und Result Groups aus.
16. Wählen Sie „Link Plate for Run“.
17. Das „Load Plate“ Fenster erscheint. Wählen Sie „Yes“.
18. Vergeben Sie im „Run Information Window“ einen Namen für den Lauf. Wählen Sie „Start Run“ (nicht gezeigt).

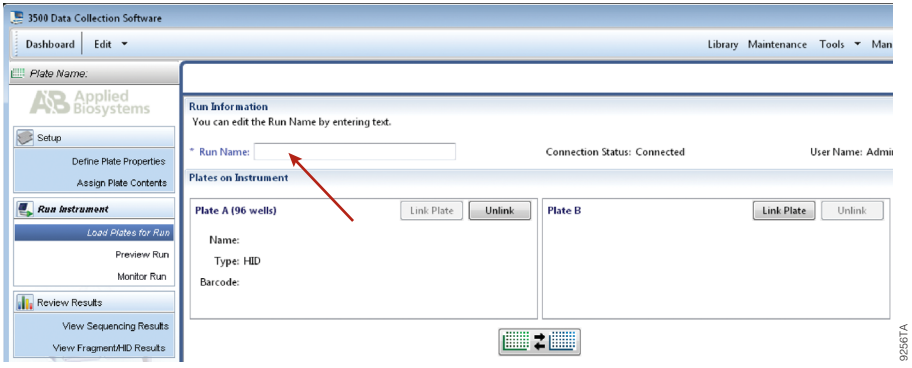

Abbildung 11. Vergabe des Laufnamens.

5.B. Detektion amplifizierter Fragmente mit dem ABI PRISM® 3100 oder 3100-*Avant* Genetic Analyzer mit Data Collection Software, Version 2.0, und dem Applied Biosystems 3130 oder 3130*xl* Genetic Analyzer mit Data Collection Software, Version 3.0

Vom Anwender bereitzustellende Materialien

- 95 °C trockener Heizblock, Wasserbad oder Thermocycler
- zerstoßenes Eis oder Eiswasserbad
- Zentrifuge, kompatibel mit 96-well-Platten
- gegen Aerosol geschützte Pipettenspitzen
- 3100 oder 3130 Kapillar-Array, 36 cm
- Performance Optimized Polymer 4 (POP-4™) für den 3100 oder 3130
- 10X genetic analyzer buffer with EDTA
- MicroAmp® Optical 96-Well Plate und Septen
- Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems Bestellnummer 4311320)
- PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 3100/3130 (Bestellnummer DG4700)

Die Qualität des Formamids ist von wesentlicher Bedeutung. Hi-Di™ Formamid verwenden. Aliquotieren Sie das Formamid bevor Sie es bei –20 °C einfrieren. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen oder längerfristige Lagerung bei 4 °C kann den Zerfall des Formamids bewirken. Formamid von schlechter Qualität kann Ionen enthalten, die während der Injektion mit der DNA konkurrieren, und somit zu geringeren Peak-Höhen und reduzierter Sensitivität führen. Eine längere Injektionszeit verstärkt das Signal nicht unbedingt.

Formamid ist ein Reizmittel und ein Teratogen. Vermeiden Sie das Einatmen und Kontakt mit der Haut. Lesen Sie vor dem Handhaben dieser Substanz das Warnetikett durch und treffen Sie entsprechende Vorsichts-maßnahmen. Tragen Sie beim Handhaben von Formamid immer Handschuhe und eine Schutzbrille.

Vorbereitung der Proben

1. Der zu ladende Cocktail wird vorbereitet, indem CC5 Internal Lane Standard 500 und Hi-Di™ Formamid folgendermaßen kombiniert und gemischt werden:

   [(1,0 µl CC5 ILS 500) × (Anzahl der Injektionen)] + [(10,0 µl Hi-Di™ Formamid) × (Anzahl der Injektionen)]

   Hinweis: Das Volumen des internen Längenstandards im Ladecocktail kann verdoppelt werden, um die Intensität der Standard-Peaks anzupassen. Belassen Sie das Volumen des Formamids bei 10,0 µl und passen Sie das Volumen, das in Schritt 3 in die Wells gegeben wird, entsprechend an.

2. Vortexen Sie 10–15 Sekunden lang.

3. Pipettieren Sie 11 µl des Gemisches von Formamid und internem Längenstandard in jedes Well.

5.B. Detektion amplifizierter Fragmente mit dem ABI PRISM® 3100 oder 3100-*Avant* Genetic Analyzer mit Data Collection Software, Version 2.0, und dem Applied Biosystems 3130 oder 3130*xl* Genetic Analyzer mit Data Collection Software Version 3.0 (Fortsetzung)

4. 1 µl der amplifizierter Probe (oder 1 µl PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix) hinzufügen. Decken Sie die Wells mit den geeigneten Septen ab.

   Hinweis: Die Detektionsgrenzen verschiedener Instrumente sind unterschiedlich, daher müssen die Injektionszeit, Injektionsspannung oder die Menge des Produkts, die mit dem zu ladenden Cocktail verwendet werden, eventuell angepasst werden. Die Injektionszeit und die Spannung können Sie im Run-Module des Module Manager in der Data Collection Software ändern (siehe unten: Vorbereitung des Instruments).

5. Zentrifugieren Sie die Platte kurz an, damit eventuelle Luftblasen aus den Wells entfernt werden.

6. Denaturieren Sie die Proben bei 95 °C 3 Minuten lang und kühlen Sie sie dann sofort danach auf zerstoßenem Eis oder in einem Eiswasserbad 3 Minuten lang ab. Die Proben müssen direkt vor dem Laden des Instruments denaturiert werden.

Vorbereitung des Instruments

Anweisungen zur Reinigung und Installation des Kapillararrays, dem Durchführen einer Spatial-Kalibrierung und zum Einfüllen von Polymer sind dem Benutzerhandbuch für das Instrument zu entnehmen.

Analysieren Sie die Proben gemäß der Beschreibung im Benutzerhandbuch für den ABI PRISM® 3100 oder 3100-*Avant* Genetic Analyzer mit Data Collection Software, Version 2.0, und dem Applied Biosystem 3130 oder 3130*xl* Genetic Analyzer mit Data Collection Software, Version 3.0. Dabei gelten die folgenden Ausnahmen.

1. Wählen Sie im Module Manager „New". Wählen Sie „Regular" von der Dropdown-Liste „Type" und „HIDFragmentAnalysis36_POP4" von der Dropdown-Liste „Template". Bestätigen Sie die Injektionszeit von 5 Sekunden, die Spannung von 3 kV und Laufzeit von 1 500 Sekunden. Geben Sie dem Run-Module einen aussagekräftigen Namen und wählen Sie „OK".

   Hinweis: Die Empfindlichkeit verschiedener Instrumente kann unterschiedlich sein. Injektionszeiten und Spannung können im Module Manager eingestellt werden. Der empfohlene Bereich für die Injektionszeit ist 3–22 Sekunden und für die Injektionsspannung 1–3 kV.

2. Wählen Sie im Protocol Manager „New". Geben Sie einen Namen für das Protokoll ein. Wählen Sie „Regular" von der Dropdown-Liste „Type" und wählen Sie das Run-Module, das Sie im vorhergehenden Schritt in der Dropdown-Liste „Run Module" erstellt haben. Wählen Sie zum Schluss „G5" von der Dropdown-Liste „Dye-Set". Wählen Sie „OK".

3. Erstellen Sie im Plate Manager einen neuen Plate Record, wie im Benutzerhandbuch für das Instrument beschrieben. Es wird ein Dialogfeld angezeigt. Wählen Sie „GeneMapper—Generic“ von der Dropdown-Liste „Application“ und dann den zutreffenden Plattentyp (96-well). Nehmen Sie Eingaben in den Fenstern „Owner“ und „Operator“ vor und wählen Sie „OK“.

   Hinweis: Wenn eine Autoanalyse der Probendaten erwünscht ist, entnehmen Sie die Anleitungen dazu bitte dem Benutzerhandbuch des Instruments.

4. Geben Sie in den Plate Record der GeneMapper Software die Namen der Proben in die entsprechenden Zellen ein. Scrollen Sie nach rechts. Wählen Sie in der Spalte „Results Group 1“ die gewünschte Ergebnisgruppe. Wählen Sie in der Spalte „Instrument Protocol 1“ das Protokoll, das Sie in Schritt 2 erstellt haben. Achten Sie darauf, dass diese Information für jede Zeile vorhanden sein muss, die einen Probennamen enthält. Wählen Sie „OK“.

   Hinweis: Um eine neue Ergebnisgruppe zu erstellen, wählen Sie „New“ von der Dropdown-Liste in der Spalte „Result Group“. Wählen Sie die Registerkarte „General“ und geben Sie einen Namen ein. Wählen Sie die Registerkarte „Analysis“ und dann „GeneMapper—Generic“ von der Dropdown-Liste „Analysis type“.

5. Setzen Sie die Proben in das Instrument ein und schließen Sie die Türen.

6. Wählen Sie im Spectral Viewer das Filterset G5 und bestätigen Sie, dass das aktive Filterset die Datei ist, die für die PowerPlex® 5-Dye Chemistry generiert wurde.

   Es ist äußerst wichtig, den richtigen G5 Spektralkalibrierungslauf für die PowerPlex® 5-Dye Chemistry zu wählen.

   Wenn das aktive Filterset nicht PowerPlex® 5-Dye Chemistry ist, wählen Sie „PowerPlex® 5-Dye Spectral“ von der „List of Calibrations for Dye Set G5“ und klicken dann auf „Set“.

7. Suchen Sie im „Run Scheduler“ den Plate Record, den Sie in Schritt 3 und 4 erstellt haben und klicken Sie einmal auf den Namen, um ihn zu markieren.

8. Wenn der Plate Record markiert ist, klicken Sie auf die grafische Plattendarstellung, die der Platte auf dem Autosampler entspricht, die Ihre amplifizierten Proben enthält.

9. Wenn der Plate Record mit der Platte verknüpft ist, wechselt die Farbe der Grafik von gelb auf grün und der grüne Pfeil „Run Instrument“ wird aktiviert.

10. Klicken Sie auf den grünen Pfeil „Run Instrument“ auf der Symbolleiste, um den Probenlauf zu starten.

11. Überwachen Sie die Elektrophorese, indem Sie die Fenster „Run“, „View“, „Array“ oder „Capillaries Viewer“ in der Data Collection Software beobachten. Jede Injektion nimmt ca. 40 Minuten in Anspruch.

5.C. Detektion amplifizierter Fragmente mit dem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer

Vom Benutzer bereitzustellende Materialien

- 95 °C trockener Heizblock, Wasserbad oder Thermocycler
- 310 Kapillaren, 47 cm × 50 µm
- Performance Optimized Polymer 4 (POP-4™)
- 10X genetic analyzer buffer with EDTA
- Probenröhrchen und Septen
- gegen Aerosol geschützte Pipettenspitzen
- Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems Bestellnummer 4311320)
- PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 310 (Bestellnummer DG4600)
- zerstoßenes Eis oder Eiswasserbad

Die Qualität des Formamids ist von wesentlicher Bedeutung. Verwenden Sie Hi-Di™ Formamid. Aliquotieren Sie das Formamid bevor Sie es bei –20 °C einfrieren. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen oder längerfristige Lagerung bei 4 °C kann den Zerfall des Formamids bewirken. Formamid von schlechter Qualität kann Ionen enthalten, die während der Injektion mit der DNA konkurrieren, und somit zu geringeren Peak-Höhen und reduzierter Sensitivität führen. Eine längere Injektionszeit verstärkt das Signal nicht unbedingt.

Formamid ist ein Reizmittel und ein Teratogen. Vermeiden Sie das Einatmen und Kontakt mit der Haut. Lesen Sie vor dem Handhaben dieser Substanz das Warnetikett durch und treffen Sie entsprechende Vorsichts-maßnahmen. Beim Handhaben von Formamid immer Handschuhe und eine Schutzbrille tragen.

Vorbereitung der Proben

1. Bereiten Sie den zu ladende Cocktail vor, indem Sie CC5 Internal Lane Standard 500 und Hi-Di™ Formamid folgendermaßen kombinieren:

   [(1,0 µl CC5 ILS 500) × (Anzahl der Injektionen)] + [(24,0 µl Hi-Di™ Formamid) × (Anzahl der Injektionen)]

   Hinweis: Das Volumen des internen Längenstandards im Ladecocktail kann verdoppelt werden, um die Intensität der Standard-Peaks anzupassen. Belassen Sie das Volumen des Formamids bei 10,0 µl und passen Sie das Volumen, das in Schritt 3 in die Wells gegeben wird, entsprechend an.

2. Vortexen Sie 10–15 Sekunden lang.

3. Mischen Sie 25,0 µl des vorbereiteten Cocktails und 1,0 µl amplifizierte Probe (oder 1 µl PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix).

   Hinweis: Die Detektionsgrenzen verschiedener Geräte sind unterschiedlich, daher müssen die Injektionszeit, Injektionsspannung oder die Menge des Produkts, die mit dem zu ladenden Cocktail verwendet werden, eventuell erhöht oder verringert werden. Die Injektionszeit und die Spannung können im Run-Module des Module Manager in der Data Collection Software geändert werden (siehe unten: Vorbereitung des Instruments).

4. Zentrifugieren Sie die Röhrchen kurz an, damit falls nötig Luftblasen aus den Wells entfernt werden.

5. Denaturieren Sie die Proben und die Leiter durch Erhitzen auf 95 °C für 3 Minuten und kühlen Sie sie dann sofort auf zerstoßenem Eis oder in einem Eiswasserbad 3 Minuten lang ab. Die Proben müssen direkt vor dem Laden denaturiert werden.

6. Stellen Sie die Röhrchen in einen geeigneten Autosampler-Einsatz.

7. Setzen Sie den Autosampler-Einsatz in das Instrument ein und schließen Sie die Türen des Instruments.

Vorbereitung des Instruments

Anleitungen zum Reinigen des Pumpenblocks, Installieren der Kapillaren, Kalibrieren des Autosamplers und Einfüllen von Polymer in die Spritze sind im Handbuch für das Instrument zu finden.

1. Öffnen Sie die ABI PRISM® 310 Data Collection Software.

2. Bereiten Sie gemäß der Beschreibung im *Benutzerhandbuch für den ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* ein GeneScan® Sample Sheet vor. Geben Sie die zutreffenden Probeninformationen in die Spalte „Sample Info" ein.

   Geben Sie in Zeilen, die „PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix" enthalten, das Wort „ladder" in die Spalte „Sample Info" für die Farben Fluorescein JOE, TMR-ET, CXR-ET und CC5 ein. Diese Informationen müssen eingegeben werden um Ihre Daten mit dem PowerTyper™ ESX 17 Macro erfolgreich analysieren zu können.

3. Erstellen Sie eine neue GeneScan® Injektionsliste. Wählen Sie mithilfe des Pulldown-Menüs das entsprechende Probenblatt.

4. Wählen Sie mithilfe des Pulldown-Menüs das Modul „GS STR POP4 (1ml) G5". Ändern Sie die Injektionszeit in 3 Sekunden und die Laufzeit in 28 Minuten. Behalten Sie die Einstellungen für übrigen Parameter wie unten gezeigt bei.

Inj. Sek.:	3
Inj. kV:	15,0
Run kV:	15,0
Run °C:	60
Run Time:	28

   Eventuell muss die Injektionszeit für einzelne Instrumente optimiert werden. Für Proben, die 0,5 ng Template-DNA enthalten, werden Injektionszeiten von 2–5 Sekunden empfohlen.

   Hinweis: Die Migration der Fragmente kann während des Verlaufs eines langen ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer Laufs leicht variieren. Die Ursache dafür können Temperatur- oder Spannungsänderungen sein. Wenn viele Proben analysiert werden, sind mehrere und zu verschiedenen Zeitpunkten des Laufs injizierte Allelleitern empfehlenswert um die akkurate Genotypisierung aller Proben zu gewährleisten.

5.C. Detektion amplifizierter Fragmente mit dem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Fortsetzung)

5. Wählen Sie die entsprechende Matrix aus.
6. Wählen Sie zur automatischen Datenanalyse das Kontrollkästchen „Auto Analyze" und die geeigneten Analysenparameter und Längenstandards aus. Genaue Informationen über diese Optionen finden Sie im Benutzerhandbuch für den ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer.
7. Stellen Sie die Proben in das Gerät und schließen Sie die Türen. Danach klicken Sie auf „Run", um den Lauf zu starten.
8. Überwachen Sie die Elektrophorese, indem Sie die Rohdaten und die Status-Fenster beobachten. Jede Probe benötigt ca. 35 Minuten für den Austausch des Polymers, die Injektion der Proben und die Elektrophorese der Probe.

6. Analysieren der Daten

6.A. PowerPlex® ESX Panel, Bin und Stutter Sets mit GeneMapper® *ID*-X Software, Version 1.2

Zur leichteren Analyse der mit dem PowerPlex® ESX 17 System generierten Daten, gibt es Panel und Bin Dateien, die die automatische Zuweisung von Genotypen mit der GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2, ermöglichen. Wir empfehlen Benutzern, an einer Schulung von Applied Biosystems zur GeneMapper® *ID*-X Software teilzunehmen, um sich mit der ordnungsgemäßen Anwendung dieser Systemsoftware vertraut zu machen.

Hinweis: Die erwähnten Panel uns Bins Sets sind mit früheren Versionen der GeneMapper® *ID*-X Software kompatibel.

Vorbereitung

1. Die Panel, Bin und Stutter Dateien für das PowerPlex® ESX 17 System können hier heruntergeladen werden: **www.promega.com/geneticidtools/panels_bins/**
2. Geben Sie Ihre Kontaktinformationen ein und wählen Sie „GeneMapper *ID*-X" dann „Submit".
3. Speichern Sie die Dateien PowerPlex_ESX_Panels_IDX_vX.x.txt, PowerPlex_ESX_Bins_IDX_vX.x.txt und PowerPlex_ESX_Stutter_IDX_vX.x.txt in einem Ordner auf Ihrem Computer ab. "X.x" steht für die neuste Version der Panel und Bin Dateien.

Importieren von Panel, Bin and Stutter Dateien

1. Öffnen Sie die GeneMapper® *ID*-X Software.
2. Wählen Sie „Tools" und dann „Panel Manager".

3. Markieren Sie das Symbol für den Panel Manager im Abschnitt oben links (linker Navigationsbereich).
4. Wählen Sie „File“ und dann „Import Panels“.
5. Navigieren Sie zum der Datei, die Sie im Abschnitt Vorbereitung gespeichert haben. Wählen Sie die Datei und „Import“.
6. Markieren Sie im Navigationsbereich den Ordner, den Sie soeben importiert haben.
7. Wählen Sie „File“ und dann „Import Bin Set“.
8. Navigieren Sie zu der Bin Datei, die Sie im Abschnitt "Vorbereitung" importiert haben. Markieren Sie die Datei und wählen Sie "Import".
9. Markieren Sie im Navigationsbereich das PowerPlex ESX Panel, das Sie in Schritt 5 importiert haben.
10. Wählen Sie „File“ und dann „Import Marker Stutter“. Ein Warnfenster wird geöffnet, in dem gefragt wird, ob Sie die aktuellen Werte überschreiben möchten. Wählen Sie „Yes“.
11. Navigieren Sie zu der gespeicherten Stutter-Datei. Wählen Sie die Datei aus und wählen Sie „Import“.
12. Wählen Sie im Fenster „Panel Manager“ unten „OK“. Daraufhin werden die importierten .txt Dateien gespeichert und das Fenster „Panel Manager“ wird geschlossen.

6.B. Erstellen eines Längenstandards mit GeneMapper® *ID*-X Software, Version 1.2

Für das Erstellen von Längenstandards stehen zwei Optionen zur Verfügung. Verwenden Sie dieses Protokoll oder das alternative Protokoll in Abschnitt 6.C.

1. Wählen Sie „Tools“ und dann „GeneMapper ID-X Manager“.
2. Wählen Sie die Registerkarte „Size Standard“.
3. Wählen Sie „New“.
4. Wählen Sie im „Size Standard Editor“-Fenster (Abbildung 12) „GeneMapper ID-X Security Group“ als „Security Group“ aus. Dadurch wird allen Benutzern der Software Zugriff gewährt. Sie können auch andere „Security Groups“ verwenden.
5. Geben Sie einen aussagekräftigen Namen wie „CC5_ILS_500_IDX“ ein.
6. Wählen Sie „Orange“ als Längenstandardfilter.
7. Geben Sie die Fragmentlängen des internen Längenstandards ein (60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 und 500 Basen).
8. Wählen Sie „OK“.

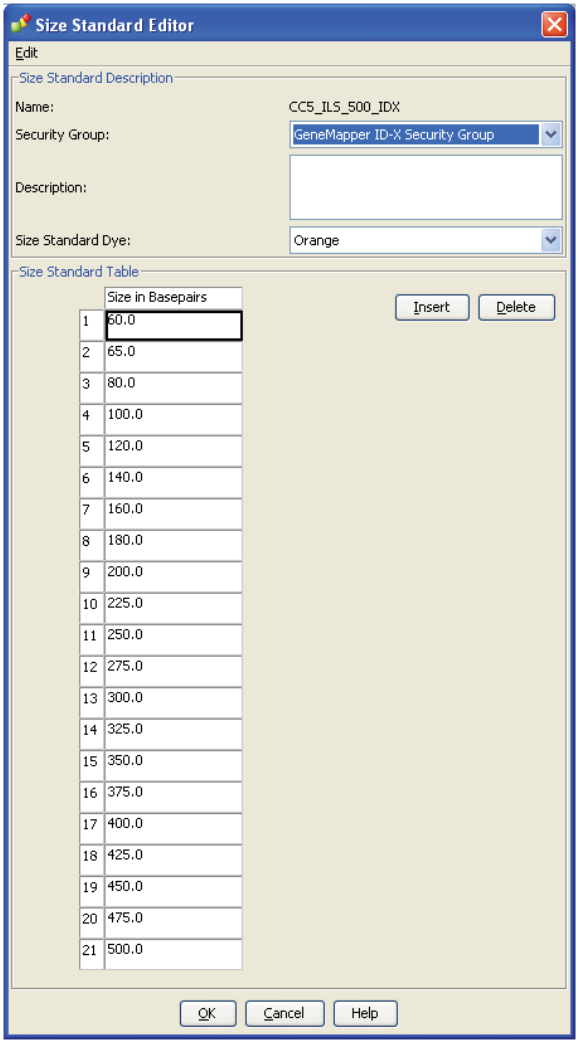

Abbildung 12. Der GeneMapper® *ID*-X Längenstandard-Editor.

6.C. Importieren des CC5 ILS 500_IDX Längenstandard in die GeneMapper® *ID*-X Software, Version 1.2

Die Datei CC5_ILS_500_IDX.xml kann hier heruntergeladen werden: **www.promega.com/geneticidtools/panels_bins/**

Speichern Sie die Datei CC5_ILS_500_IDX.xml in einem Ordner auf Ihrem Computer ab.

1. Wählen Sie „Tools“ und dann „GeneMapper ID-X Manager“.
2. Wählen Sie die Registerkarte „Size Standard“.
3. Wählen Sie „Import“.
4. Navigieren Sie zum Speicherort der Datei „CC5_ILS_500_IDX.xml“ auf Ihrem Computer.
5. Markieren Sie die Datei und wählen Sie „Import“.
6. Wählen Sie „Done“, um die Änderungen zu speichern und den GeneMapper ID-X Manager zu schließen.

6.D. Erstellen einer Methode zur Spurenanalyse mit GeneMapper® *ID*-X Software, Version 1.2

Diese Anleitung ist als erste Starthilfe zum Analysieren von Daten mit der GeneMapper® *ID*-X Software gedacht. Sie kann jedoch nicht eine Schulung für den Gebrauch der GeneMapper® *ID*-X Software ersetzen. Wir empfehlen Benutzern, sich bezüglich Schulungen zu dieser Systemsoftware an Applied Biosystems zu wenden.

1. Wählen Sie „Tools“ und dann „GeneMapper ID-X Manager“.
2. Wählen Sie die Registerkarte „Analysis Methods“.
3. Wählen Sie „New“. Ein neues Dialogfeld „Analysis Method“ wird geöffnet.
4. Wählen Sie im „Analysis Method Editor“-Fenster „GeneMapper ID-X Security Group“ als „Security Group“ aus. Dadurch wird allen Benutzern der Software Zugriff gewährt. Sie können auch andere „Security Groups“ verwenden.
5. Geben Sie für die Analysemethode einen aussagekräftigen Namen wie „PowerPlexESX 17“ ein.
6. Wählen Sie die Registerkarte „Allele“ (Abbildung 13).
7. Wählen Sie den Bin File, den Sie im Schritt 6.A importiert haben.
8. Stellen Sie sicher, dass das Kästchen „Use marker-specific stutter ratio if available“ angekreuzt ist.

9. Geben Sie die Werte aus Abbildung 13 ein, um ein korrektes Filtern der Stutter-Peaks bei Verwendung des PowerPlex® ESX 17 Systems zu gewährleisten. Eventuell müssen Sie diese Einstellungen optimieren. Interne Validierungen sollten durchgeführt werden.

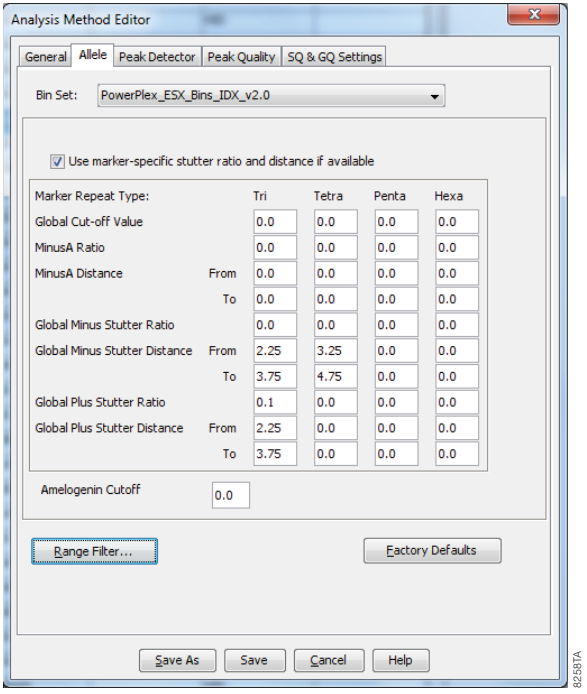

Abbildung 13. Registerkarte „GeneMapper® *ID*-X Allele". Wählen Sie die Bin Datei, die in Abschnitt 6.A importiert wurde.

10. Wählen Sie die Registerkarte „Peak Detector". Abbildung 14 zeigt ein Beispiel für Einstellungen, die bei Promega eingesetzt werden. Führen Sie In-House-Validierungen durch.

    Hinweise:

    1. Wählen Sie als Analysebereich „Full Range" oder „Partial Range". Wenn Sie „Partial Range" verwenden, müssen Sie einen auf Ihre Daten abgestimmten Analysebereich wählen. Wählen Sie einen Startpunkt hinter dem Primer-Peak und direkt vor dem ersten definierten Peak des internen Längenstandards, um die richtige Längenzuordnung des internen Längenstandards zu gewährleisten.
    2. Die „Peak Amplitude Thresholds" definieren die kleinsten Peak-Höhen, die die Software als Peak benennt. Die Werte für „Peak Amplitude Thresholds" liegen im Allgemeinen bei 50–150 RFU und müssen individuell vom Labor ermittelt werden für die ABI PRISM®

310, 3100 und 3100-*Avant* Genetic Analyzers und Applied Biosystems 3130 und 3130*xl* Genetic Analyzers. Für die Applied Biosystems 3500 und 3500xL Genetic Analyzers empfiehlt Life Technologies einen Threshold von 175 RFU bei Standard-Injektionsbedingungen. Jedoch sollten die Werte individuell durch interne Validierungen bestimmt werden. Beim CCS ILS 500 sind die Peak-Höhen generell niedriger als für andere Farbstoffe. Daher kann der Grenzwert des Orangen-Farbstoffs geringer sein als für andere Farbstoffe.

3. Der Haken im Normalisierungskästchen kann gesetzt werden, unabhängig davon, ob die Daten während der Datensammlung normalisiert wurden.

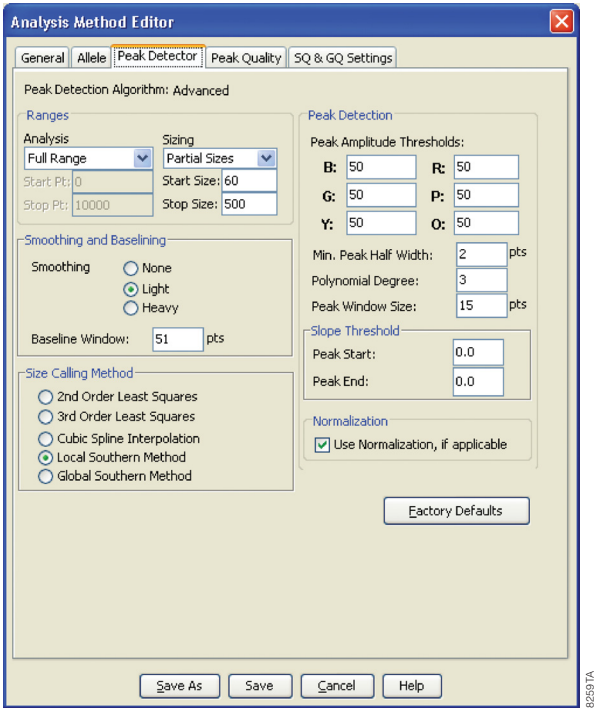

Abbildung 14. Registerkarte „GeneMapper® *ID*-X Peak Detector“.

11. Wählen Sie die Registerkarte „Peak Quality“. Sie können die Einstellungen für die Peak-Qualität ändern.

    Hinweis: Weitere Informationen über Schritt 11 und 12 sind im Benutzerhandbuch für den GeneMapper® *ID*-X enthalten.

12. Wählen Sie die Registerkarte „SQ & GC Settings". Sie können diese Einstellungen ändern.

13. Wählen Sie „Save“, um die neue Analysemethode zu speichern.

14. Wählen Sie „Done“, um den GeneMapper ID-X Manager zu beenden.

6.D. Erstellen einer Methode zur Spurenanalyse mit GeneMapper® *ID*-X Software, Version 1.2 (Fortsetzung)

Bearbeiten von Daten von Spurenmaterial.

1. Wählen Sie „File“ und dann „New Project“.
2. Wählen Sie „Edit“ und dann „Add Samples to Project“.
3. Gehen Sie zum Speicherort der Dateien für den Lauf. Markieren Sie die gewünschten Dateien und wählen Sie „Add to list“ und dann „Add“.
4. Verwenden Sie das Dropdown-Menü in der Spalte „Sample Type“, um jeder Probe die richtige Bezeichnung zuzuordnen („Allelic Ladder“, „Sample“, „Positive Control“ oder „Negative Control“). Zur fehlerfreien Genotypisierung muss jeder Ordner des Projekts mindestens eine Injektion der Allelleiter enthalten, die in der Spalte „Sample Type“ als „Allelic Ladder“ bezeichnet ist.
5. Wählen Sie in der Spalte „Analysis Method“ die oben erstellte Analysemethode.
6. Wählen Sie in der Spalte „Panel“ die Panel-Datei, die Sie in Abschnitt 6.A importiert haben.
7. Wählen Sie in der Spalte „Size Standard“ den Längenstandard, der in Abschnitt 6.B erstellt oder in Abschnitt 6.C importiert wurde.
8. Wenn Daten von einem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer analysiert werden, achten Sie darauf, dass in der Spalte „Matrix“ die richtige Matrixdatei ausgewählt ist.
9. Wählen Sie „Analyze“ (grüne Pfeilschaltfläche), um die Datenanalyse zu beginnen.

   Hinweis: Als Voreinstellung zeigt die Software nach der Qualitätsprüfung die folgenden Übersichten: „Analysis Requirement Summary”, „Allelic Ladder Analysis Summary” und „Analysis Summary”. Stellen Sie sicher, dass alle Anforderungen erfüllt sind, wenn die jeweiligen Fenster erscheinen. Sollte das Fenster „Analysis Requirement Summary” nicht aktiviert sein, kann es nötig sein eine manuelle Fehlerbehebung durchzuführen.
10. Wenn die Analyse-Anforderungen erfüllt sind, öffnet sich ein „Save Project” Fenster (Abbildung 15).

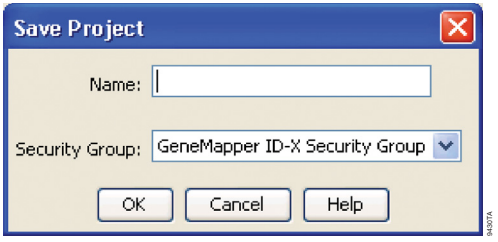

Figure 15. Das „Save Project” Fenster.

11. Geben Sie den Projektnamen ein.

12. Wählen Sie die entsprechende „Security Group" aus dem Drop-Down-Menü aus und wählen Sie „OK".

Nach Ende der Analyse erscheint der „Analysis Summary" Bildschirm. Wir empfehlen, dass Sie alle gelben und roten Markierungen in den Kopfzeilen in der Plot-Ansicht prüfen und mit Ihnen nach Standardlaborprozeduren umgehen. Navigieren Sie zur Genotyp- oder Sample-Reiterkarte. Um die Überprüfung von Proben mit geringer Qualität zu erleichtern, benutzen Sie den Standard „Data Interpretation" Plot und prüfen Sie die „Quality Value Details" Tabelle.

In den „Analysis Method Peak Quality-" und den „SQ & GQ Settings-" Reitern sind Standardwerte angegeben. Diese wirken sich auf die Qualitätswerte in den Plot-Einstellungen aus. Wir empfehlen die Werte an die Datenanalyseprotokolle anzupassen.

6.E. Erstellen einer Methode zur Datenbank- oder Vaterschaftsanalyse mit GeneMapper® *ID*-X Software, Version 1.2

Diese Anleitung ist als erste Starthilfe zum Analysieren von Daten mit der GeneMapper® *ID*-X Software gedacht. Sie kann jedoch keine Schulung für den Gebrauch der GeneMapper® *ID*-X Software ersetzen. Wir empfehlen Benutzern, sich bezüglich Schulungen zum ausführlichen Gebrauch dieser Systemsoftware an Applied Biosystems zu wenden.

1. Wählen Sie „Tools" und dann „GeneMapper ID-X Manager".
2. Wählen Sie die Registerkarte „Analysis Methods".
3. Wählen Sie „New". Ein neues Dialogfeld „Analysis Method" wird geöffnet.
4. Wählen Sie im „Analysis Method Editor"-Fenster „GeneMapper ID-X Security Group" als „Security Group" aus. Dadurch wird allen Benutzern der Software Zugriff gewährt. Sie können auch andere „Security Groups" verwenden.
5. Geben Sie einen aussagekräftigen Namen für die Analysenmethode, wie „PowerPlexESX 17 20% Filter" ein.
6. Wählen Sie die Registerkarte „Allele" (Abbildung 16).
7. Wählen Sie das Bin Set, das Sie in Abschnitt 6.A. importiert haben.

6.E. Erstellen einer Methode zur Datenbank- oder Vaterschaftsanalyse mit GeneMapper® *ID*-X Software, Version 1.2 (Fortsetzung)

8. Geben Sie die Werte aus Abbildung 16 ein, um ein korrektes Filtern der Stutter-Peaks bei Verwendung des PowerPlex® ESX 17 Systems zu gewährleisten. Eventuell müssen Sie diese Einstellungen optimieren. Interne Validierungen sollten durchgeführt werden.

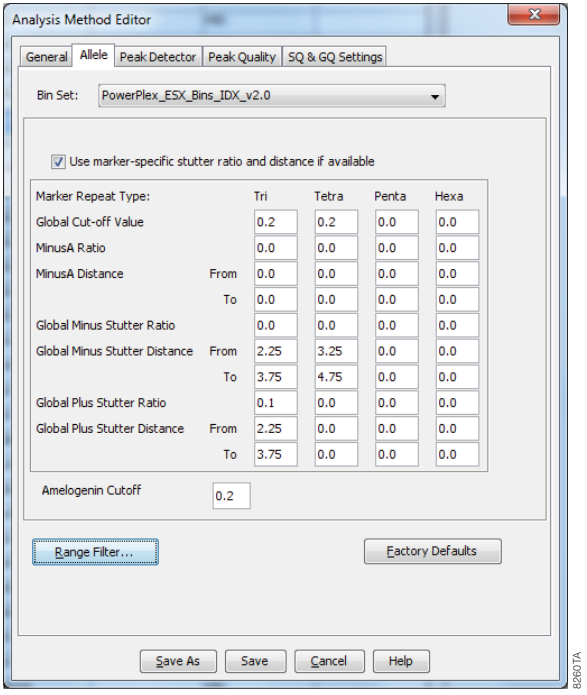

Abbildung 16. Registerkarte „GeneMapper® *ID*-X Allele". Wählen Sie das Bin Set, das Sie in Abschnitt 6.A. importiert haben.

9. Wählen Sie die Registerkarte „Peak Detector". Abbildung 14 zeigt ein Beispiel für die Einstellungen, die bei Promega genutzt werden.

   Hinweise:

   1. Wählen Sie als Analysebereich „Full Range" oder „Partial Range". Wenn Sie „Partial Range" verwenden, müssen Sie einen auf Ihre Daten abgestimmten Analysebereich wählen. Wählen Sie einen Startpunkt hinter dem Primer-Peak und direkt vor dem ersten definierten Peak des internen Längenstandards, um die richtige Längenzuordnung des internen Längenstandards zu gewährleisten.
   2. Die „Peak Amplitude Thresholds" definieren die kleinsten Peak-Höhen, die die Software als Peak benennt. Die Grenzwerte der Peak Amplitude Thresholds liegen gewöhnlich bei 50–150 RFU für den ABI PRISM® 310, 3100 und 3100-*Avant* Genetic Analyzers und

Applied Biosystems 3130 und 3130xl Genetic Analyzers. Für den Applied Biosystems 3500 und 3500xl Genetic Analyzers, empfiehlt Life Technologies einen Analysebereich von 175 RFU bei den Injektionskonditionnen-Standardeinstellungen. Dennoch sollten die Werte durch interne Validierungen bestimmen. Beim CCS ILS 500 sind die Peak-Höhen generell niedriger als für andere Farbstoffe. Daher kann der Grenzwert des Orangen-Farbstoffs geringer sein als für andere Farbstoffe.

3. Der Haken im Normalisierungskästchen kann gesetzt werden, unabhängig davon, ob die Daten während der Datensammlung normalisiert wurden.

10. Wählen Sie die Registerkarte „Peak Quality". Sie können die Einstellungen für die Peak-Qualität ändern.

    Hinweis: Weitere Informationen über Schritt 11 und 12 sind im Benutzerhandbuch für den GeneMapper® *ID*-X enthalten.

11. Wählen Sie die Registerkarte „SQ & GQ Settings". Sie können diese Einstellungen ändern.

12. Wählen Sie „Save", um Ihre Einstellungen zu speichern.

13. Wählen Sie „Done", um den GeneMapper ID-X Manager zu beenden.

Bearbeiten von Daten von Proben zur Datenbank- oder Vaterschaftsanalyse

1. Wählen Sie „File" und dann „New Project".

2. Wählen Sie „Edit" und dann „Add Samples to Project".

3. Gehen Sie zum Speicherort der Dateien für den Lauf. Markieren Sie die gewünschten Dateien und wählen Sie „Add to list" und dann „Add".

4. Verwenden Sie das Dropdown-Menü in der Spalte „Sample Type", um jeder Probe die richtige Bezeichnung zuzuordnen („Allelic Ladder", „Sample", „Positive Control" oder „Negative Control"). Zur fehlerfreien Genotypisierung muss jeder Ordner des Projekts mindestens eine Injektion der Allelleiter enthalten, die in der Spalte „Sample Type" als „Allelic Ladder" bezeichnet ist.

   Wählen Sie in der Spalte „Analysis Method" die oben erstellte Analysemethode.

5. Wählen Sie in der Spalte „Panel"das Panel, das Sie in Abschnitt 6.A importiert haben.

6. Wählen Sie in der Spalte „Size Standard" den Längenstandard, der in Abschnitt 6.B erstellt oder in Abschnitt 6.C importiert wurde.

7. Wenn Daten von einem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer analysiert werden, achten Sie darauf, dass in der Spalte „Matrix" die richtige Matrixdatei ausgewählt ist.

6.E. Erstellen einer Methode zur Datenbank- oder Vaterschaftsanalyse mit GeneMapper® *ID*-X Software (Fortsetzung)

8. Wählen Sie „Analyze“ (grüne Pfeilschaltfläche), um die Datenanalyse zu beginnen.

   Hinweis: Als Voreinstellung zeigt die Software nach der Qualitätsprüfung die folgenden Übersichten: „Analysis Requirement Summary”, „Allelic Ladder Analysis Summary” und „Analysis Summary”. Stellen Sie sicher, dass alle Anforderungen erfüllt sind, wenn die jeweiligen Fenster erscheinen. Sollte das Fenster „Analysis Requirement Summary” nicht aktiviert sein, kann es nötig sein eine manuelle Fehlerbehebung durchzuführen.

9. Wenn die Analyse-Anforderungen erfüllt sind, öffnet sich ein „Save Project” Fenster.

10. Geben Sie den Projektnamen ein.

11. Wählen Sie die entsprechende „Security Group “ aus dem Drop-Down-Menü aus und wählen Sie „OK.

Nach Ende der Analyse erscheint der „Analysis Summary“ Bildschirm. Wir empfehlen, dass Sie alle gelben und roten Markierungen in den Kopfzeilen in der Plot-Ansicht prüfen und mit Ihnen nach Standardlaborprozeduren umgehen. Navigieren Sie zur Genotyp- oder Sample-Reiterkarte. Um die Überprüfung von Proben mit geringer Qualität zu erleichtern, benutzen Sie den Standard „Data Interpretation“ Plot und prüfen Sie die „Quality Value Details“ Tabelle.

In den „Analysis Method Peak Quality-” und den „SQ & GQ Settings-” Reitern sind Standardwerte angegeben. Diese wirken sich auf die Qualitätswerte in den Plot-Einstellungen aus. Wir empfehlen die Werte in den Reitern an die Datenanalyseprotokolle anzupassen.

6.F. PowerPlex® ESX Panel und Bin Sets mit GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2

Zur leichteren Analyse der mit dem PowerPlex® ESX 17 System generierten Daten, gibt es Panel und Bin Dateien, die die automatische Zuweisung von Genotypen mit der GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2, ermöglichen. Wir empfehlen Benutzern der GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2, die Anleitung *Applied Biosystems GeneMapper®* ID *Software Human Identification Analysis* vollständig zu lesen, um sich mit dem ordnungsgemäßen Betrieb der Software vertraut zu machen. Benutzern der GeneMapper® *ID* Software, Version 3.1 wird empfohlen, auf Version 3.2 zu aktualisieren.

Für eine Analyse mit der GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2, benötigen Sie die entsprechenden Panel- und Bin-Dateien: PowerPlex_ESX_Panels_vX.x.txt und PowerPlex_ESX_Bins_vX.x.txt, wobei „X.x” für die neuste Version der Panel- und Bin-Datein steht.

Erste Schritte

1. Die Panel und Bin Dateien für das PowerPlex® ESX 17 System können hier heruntergeladen werden: **www.promega.com/geneticidtools/panels_bins/**
2. Geben Sie Ihre Kontaktdaten ein und wählen Sie „GeneMapper ID version 3.2". Wählen Sie „Submit".
3. Speichern Sie die Dateien PowerPlex_ESX_Panels_vX.x.txt und PowerPlex_ESX_Bins_vX.x.txt in einem Ordner auf Ihrem Computer ab.

Importieren der Panel und Bin Dateien

Die folgenden Anweisungen entsprechen größtenteils dem Tutorial für die Applied Biosystems GeneMapper® *ID* Software, Seiten 1–4.

1. Öffnen Sie die GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2.
2. Wählen Sie „Tools" und dann „Panel Manager".
3. Markieren Sie das Symbol für den Panel Manager im Abschnitt oben links (Navigationsbereich).
4. Wählen Sie „File" und dann „Import Panels".
5. Navigieren Sie zu der gespeicherten Panel-Datei. Wählen Sie die Datei und dann „Import".
6. Markieren Sie im Navigationsbereich das PowerPlex ESX Panel, das Sie soeben importiert haben.
7. Wählen Sie „File" und dann „Import Bin Set".
8. Navigieren Sie zu der gespeicherten Bin Datei, die Sie im Abschnitt Vorbereitung heruntergeladen haben. Markieren Sie die PowerPlex-ESX_Bins_v.X.x und dann „Import".
9. Wählen Sie im Fenster „Panel Manager" unten „OK". Das Fenster „Panel Manager" schließt sich automatisch.

6.G. Erstellen eines Längenstandards mit GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2

Für das Erstellen von Längenstandards stehen zwei Optionen zur Verfügung. Sie können dieses Protokoll oder das Alternativprotokoll in Abschnitt 6.H verwenden.

1. Wählen Sie „Tools" und dann „GeneMapper Manager".
2. Wählen Sie die Registerkarte „Size Standard".
3. Wählen Sie „New".

6.G. Erstellen eines Längenstandards mit GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2 (Fortsetzung)

4. Wählen Sie „Basic or Advanced“ (Abbildung 17). Die ausgewählte Analysemethode muss mit der angelegten Analysemethode übereinstimmen. Wählen Sie „OK“.

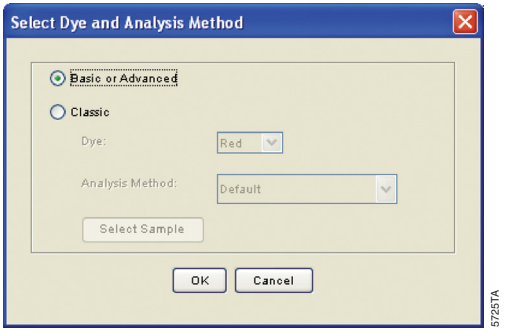

Abbildung 17. Das Fenster „Select Dye and Analysis Method“.

5. Geben Sie einen aussagekräftigen Namen wie „CC5 ILS 500 advanced“ in den Size Standard Editor ein (Abbildung 18).

6. Wählen Sie als Farbe für den Längenstandardfilter „Orange“.

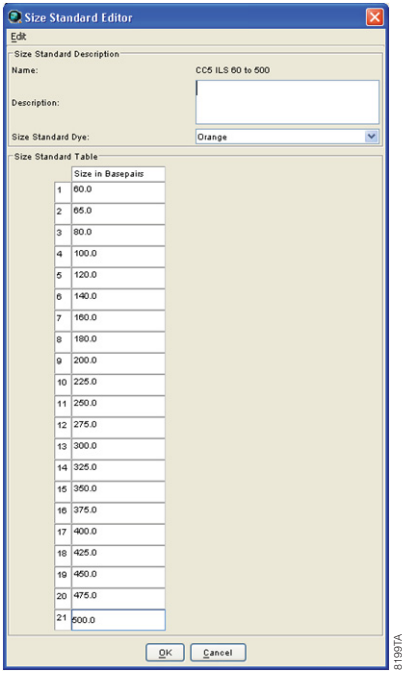

Abbildung 18. Der Längenstandard-Editor.

7. Geben Sie die Fragmentlängen des internen Längenstandards ein (60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 und 500 Basen).
8. Wählen Sie „OK“.

6.H. Importieren des CC5 ILS 500 Size Standard in die GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2

Die Datei CC5_ILS_500.xml kann hier heruntergeladen werden: **www.promega.com/geneticidtools/panels_bins/**

Speichern Sie die Datei CC5_ILS_500.xml in einem Ordner auf Ihrem Computer ab.

1. Wählen Sie „Tools“ und dann „GeneMapper Manager“.
2. Wählen Sie die Registerkarte „Size Standard“.
3. Wählen Sie „Import“.
4. Gehen Sie zum Speicherort der Datei CC5_ILS_500.xml.
5. Markieren Sie die Datei und wählen Sie „Import“.
6. Wählen Sie „Done“, um die Änderungen zu speichern und schließen Sie den GeneMapper Manager.

6.I. Erstellen einer Methode zur Spurenanalyse mit GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2

Die folgenden Anweisungen entsprechen größtenteils dem Tutorial für die Applied Biosystems GeneMapper® *ID* Software, Seiten 5–11.

1. Wählen Sie „Tools“ und dann „GeneMapper Manager“.
2. Wählen Sie die Registerkarte „Analysis Methods“.
3. Wählen Sie „New“. Ein neues Dialogfeld „Analysis Method“ wird geöffnet.
4. Wählen Sie „HID“ und dann „OK“.

   Hinweis: Wenn Sie die Option „HID“ nicht sehen können, haben Sie die GeneMapper® *ID* Software nicht. Wenden Sie sich an Applied Biosystems.
5. Geben Sie für die Analysemethode einen aussagekräftigen Namen wie „PowerPlexESX 17“ ein.
6. Wählen Sie die Registerkarte „Allele“ (Abbildung 19).
7. Wählen Sie das Bin Set, das Sie in Abschnitt 6.F importiert haben.
8. Stellen Sie sicher, dass das Kästchen „Use marker-specific stutter ratio if available“ angekreuzt ist.

6.I. Erstellen einer Methode zur Spurenanalyse mit GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2 (Fortsetzung)

9. Geben Sie die Werte aus Abbildung 19 ein, um ein korrektes Filtern der Stutter-Peaks bei Verwendung des PowerPlex® ESX 17 Systems zu gewährleisten. Erklärungen zum richtigen Einsatz und den Auswirkungen dieser Einstellungen finden Sie im Benutzer-Datenblatt mit dem Titel „*Installation Procedures and New Features for GeneMapper* ID *Software 3.2*“.

   Hinweis: Einige Einstellungen wurden optimiert und unterscheiden sich von den Einstellungen, die im Benutzer-Datenblatt empfohlen werden.

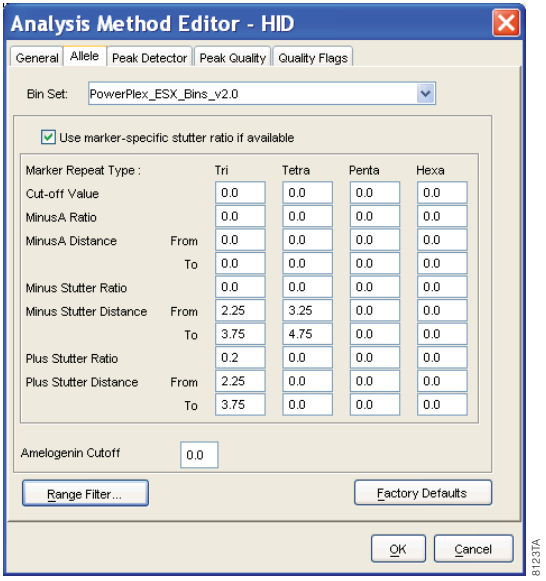

Abbildung 19. Registerkarte „Allele“. Wählen Sie die Datei, die Sie in Abschnitt 6.F importiert haben.

10. Wählen Sie die Registerkarte „Peak Detector“. Wir empfehlen die in Abbildung 20 gezeigten Einstellungen.

    Hinweise:

    1. Wählen Sie als Analysebereich „Full Range“ oder „Partial Range“. Wenn Sie die Einstellung „Partial Range“ verwenden, müssen Sie einen auf Ihre Daten abgestimmten Analysebereich wählen. Wählen Sie einen Startpunkt hinter dem Primer-Peak und direkt vor dem ersten definierten Peak des internen Längenstandards, um die richtige Längenzuordnung des internen Längenstandards zu gewährleisten.

2. Die „Peak Amplitude Thresholds“ definieren die kleinsten Peak-Höhen, die die Software als Peak benennt. Die Werte für „Peak Amplitude Thresholds“ liegen im Allgemeinen bei 50–150 RFU und müssen individuell vom Labor ermittelt werden. Beim CCS ILS 500 sind die Peak-Höhen generell niedriger als für andere Farbstoffe. Daher kann der Grenzwert des Orangen-Farbstoffs geringer sein als für andere Farbstoffe.

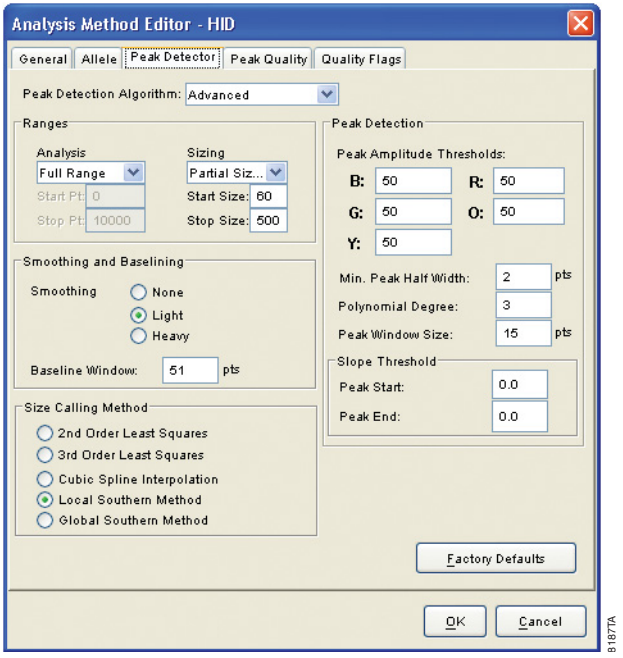

Abbildung 20. Registerkarte „Peak Detector“ im GeneMapper® *ID*.

11. Wählen Sie die Registerkarte „Peak Quality“. Sie können die Einstellungen für die Peak-Qualität ändern.

    Hinweis: Weitere Informationen über Schritt 11 und 12 sind im Benutzerhandbuch für den GeneMapper® *ID* enthalten.

12. Wählen Sie die Registerkarte „Quality Flags“. Sie können diese Einstellungen ändern.

13. Wählen Sie „OK“, um Ihre Einstellungen zu speichern.

6.I. Erstellen einer Methode zur Spurenanalyse mit GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2 (Fortsetzung)

Bearbeiten von Daten von Spurenmaterial.

1. Wählen Sie „File“, dann „New Project“.
2. Wählen Sie „Edit“, dann „Add Samples to Project“.
3. Navigieren Sie zu den Runfiles. Wählen Sie die gewünschten aus, wählen Sie dann „Add to list“ und dann „Add“.
4. Verwenden Sie das Dropdown-Menü in der Spalte „Sample Type“, um jeder Probe die richtige Bezeichnung zuzuordnen („Ladder“, „Sample“, „Positive Control“ oder „Negative Control“). Zur fehlerfreien Genotypisierung muss jeder Ordner des Projekts mindestens eine Injektion der Allelleiter enthalten, die in der Spalte „Sample Type“ als „Ladder“ bezeichnet ist.
5. Wählen Sie in der Spalte „Analysis Method“ die oben erstellte Analyse-methode.
6. Wählen Sie in der Spalte „Panel“ das Panel-Set, das in Abschnitt 6.F importiert wurde.
7. Wählen Sie in der Spalte „Size Standard“ den Längenstandard, der in Abschnitt 6.G erstellt oder in Abschnitt 6.H importiert wurde.
8. Wenn Daten von einem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer analysiert werden, achten Sie darauf, dass in der Spalte „Matrix“ die richtige Matrixdatei ausgewählt ist.
9. Wählen Sie „Analyze“ (grüne Pfeilschaltfläche), um die Datenanalyse zu beginnen.

6.J. Erstellen einer Methode zur Datenbank- oder Vaterschaftstest-Analyse mit GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2

1. Wählen Sie „Tools“ und dann „GeneMapper Manager“.
2. Wählen Sie die Registerkarte „Analysis Methods“.
3. Wählen Sie „New“. Ein neues Dialogfeld „Analysis Method“ wird geöffnet.
4. Wählen Sie „HID“ und dann „OK“.

   Hinweis: Wenn Sie die Option „HID“ nicht sehen können, haben Sie die GeneMapper® *ID* Software nicht. Wenden Sie sich bitte an Applied Biosystems.
5. Geben Sie einen aussagekräftigen Namen für die Analysenmethode ein, z. B. „PowerPlexESX 17_20%filter“.
6. Wählen Sie die Registerkarte „Allele“ (Abbildung 21).
7. Wählen Sie das zum PowerPlex® ESX 17 System gehörende Bin Set, das in Abschnitt 6.F importiert wurde.
8. Stellen Sie sicher, dass das Kästchen „Use marker-specific stutter ratio if available“ angekreuzt ist.

9. Geben Sie die Werte aus Abbildung 21 ein, damit beim Einsatz des PowerPlex® ESX 17 Systems die Peaks korrekt gefiltert werden. Erklärungen zum richtigen Einsatz und den Auswirkungen dieser Einstellungen finden Sie im Benutzer-Datenblatt mit dem Titel „*Installation Procedures and New Features for GeneMapper* ID *Software* 3.2“.

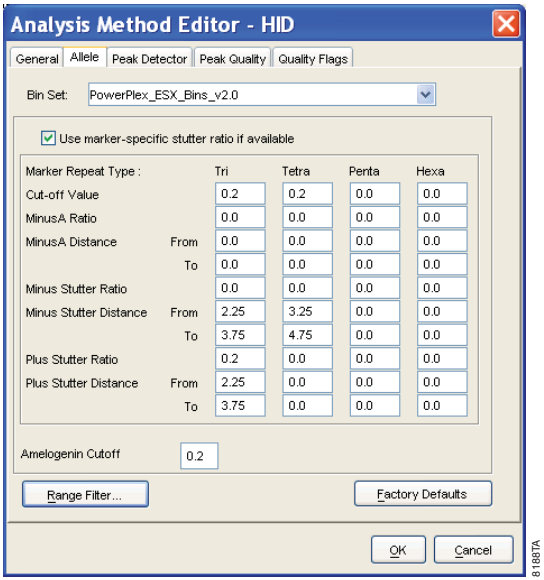

Abbildung 21. Registerkarte „Allele“ des GeneMapper® *ID* mit Einstellungen für den Gebrauch eines 20 % Peak-Filters. Wählen Sie das Bin Set, das in Abschnitt 6.F importiert wurde.

10. Wählen Sie die Registerkarte „Peak Detector“. Wir empfehlen die in Abbildung 20 gezeigten Einstellungen.

    Hinweise:

    1. Wählen Sie als Analysebereich „Full Range“ oder „Partial Range“. Wenn Sie „Partial Range“ verwenden, müssen Sie einen auf Ihre Daten abgestimmten Analysebereich wählen. Wählen Sie einen Startpunkt hinter dem Primer-Peak und direkt vor dem ersten definierten Peak des internen Längenstandards, um die richtige Längenzuordnung des internen Längenstandards zu gewährleisten. Beim CCS ILS 500 sind die Peak-Höhen generell niedriger als für andere Farbstoffe. Daher kann der Grenzwert des Orangen-Farbstoffs geringer sein als für andere Farbstoffe.
    2. Die „Peak Amplitude Thresholds“ definieren die kleinsten Peak-Höhen, die die Software als Peak benennt. Die Werte für „Peak Amplitude Thresholds“ liegen im Allgemeinen bei 50–150 RFU und müssen individuell vom Labor ermittelt werden.

6.J. Erstellen einer Methode zur Datenbank- oder Vaterschaftstest-Analyse mit GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2 (Fortsetzung)

11. Wählen Sie die Registerkarte „Peak Quality“. Sie können die Einstellungen für die Peak-Qualität ändern.

    Hinweis: Weitere Informationen über Schritt 11 und 12 sind im Benutzerhandbuch für den GeneMapper® *ID* enthalten.

12. Wählen Sie die Registerkarte „Quality Flags“. Sie können diese Einstellungen ändern.

13. Wählen Sie „OK“, um Ihre Einstellungen zu speichern.

Bearbeiten von Daten von Proben zur Datenbank- oder Vaterschaftsanalyse

1. Wählen Sie „File“, dann „New Project“.

2. Wählen Sie „Edit“, dann „Add Samples to Project“.

3. Navigieren Sie zu den Runfiles. Wählen Sie die gewünschten aus, wählen Sie dann „Add to list“ und dann „Add“.

4. Verwenden Sie das Dropdown-Menü in der Spalte „Sample Type“, um jeder Probe die richtige Bezeichnung zuzuordnen („Ladder“, „Sample“, „Positive Control“ oder „Negative Control“). Zur fehlerfreien Genotypisierung muss jeder Ordner des Projekts mindestens eine Injektion der Allelleiter enthalten, die in der Spalte „Sample Type“ als „Ladder“ bezeichnet ist.

5. Wählen Sie in der Spalte „Analysis Method“ die oben erstellte Analysemethode.

6. Wählen Sie in der Spalte „Panel“ das Panel-Set, das in Abschnitt 6.F importiert wurde.

7. Wählen Sie in der Spalte „Size Standard“ den Längenstandard, der in Abschnitt 6.G erstellt oder in Abschnitt 6.H importiert wurde.

8. Wenn Daten von einem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer analysiert werden, achten Sie darauf, dass in der Spalte „Matrix“ die richtige Matrixdatei ausgewählt ist.

9. Wählen Sie „Analyze“ (grüne Pfeilschaltfläche), um die Datenanalyse zu beginnen.

6.K. Probenanalyse mit der GeneScan® Software und Windows®-Betriebsystemen

1. Analysieren von Daten mit der GeneScan® Analysis Software

2. Prüfen Sie die Rohdaten für einen oder mehrere Probenläufe. Markieren Sie den Namen der Probe und wählen Sie dann „Raw Data“ im Menü „Sample“. Ziehen Sie den Cursor, so dass sich das Fadenkreuz auf der Basislinie rechts des großen Primer-Peaks befindet (vor dem ersten Peak des internen Längenstandards [orange]). Verwenden Sie den X-Wert, der unten links im Fenster angezeigt wird, als Startposition in den Analyseparametern.

3. Die empfohlenen Analyseparameter sind in Abbildung 22 abgebildet. Die „Peak Amplitude Thresholds“ definieren die kleinsten Peak-Höhen, die die Software als Peak benennt. Die Grenzwerte der Peak Amplitude Thresholds liegen gewöhnlich bei 50–150 RFU und müssen individuell vom Labor ermittelt werden. Verwenden Sie 50 RFU als Grenzwert der Peak-Amplitude für den CC5-Filter (nicht dargestellt).

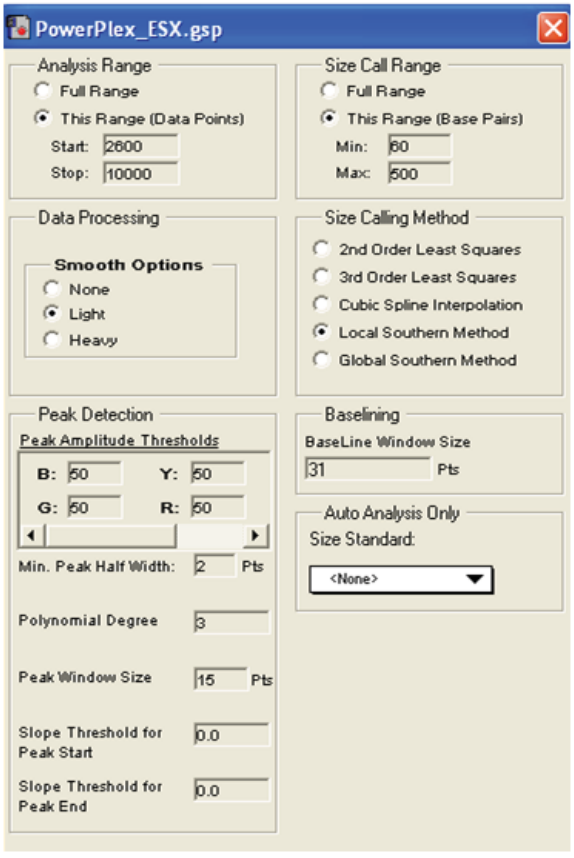

Abbildung 22. Das Fenster „Analysis Parameters“. Der Startpunkt des Analysebereichs kann variieren. Er wird in Abschnitt 6.K, Schritt 2 definiert.

4. Die Analyseparameter können im Ordner „Params“ gespeichert werden, der sich bei den meisten Installationen hier befindet: C:\AppliedBio\Shared\Analysis\Sizecaller\Params

5. Verwenden Sie die gespeicherte Analyseparameterdatei für die Proben.

6.K. Probenanalyse mit der GeneScan® Software und Windows®-Betriebsystemen (Fortsetzung)

6. Definieren Sie einen neuen Längenstandard. Wählen Sie einen Probenlauf aus und markieren Sie den Pfeil neben dem Längenstandard. Wählen Sie „define new“. Beschriften Sie die Längenstandard-Peaks mit 60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 375, 400, 425, 450, 475 und 500 Basen. Speichern Sie den Längenstandard im Ordner „Size Standards“ unter:
C:\AppliedBio\Shared\Analysis\Sizecaller\SizeStandards

7. Wenden Sie den definierten „Size Standard“ auf die Proben an, und analysieren Sie dann die Proben. In Abschnitt 6.M sind zusätzliche Informationen über den Gebrauch des PowerTyper™ ESX 17 Macros und der Genotyper® Software zu finden.

Hinweise:

1. Peak-Höhen außerhalb des linearen Bereichs des Instruments können Artefakt-Peaks aufgrund von Instrumentensättigung (d. h. Überladen der Probe) sein. Es kann zur Überstrahlung (Pull-Ups) von einer Farbe durch eine andere kommen. Gesättigte Signale können auch als Doppel-Peak (Split Peak) auftreten.
2. Wenn sich die Peak-Höhen nicht im linearen Detektionsbereich des Instruments befinden, nimmt das Verhältnis von Stutter-Peaks zu tatsächlichen Allel-Peaks zu, und die Interpretation von Profilen wird schwierig. Auch die Peak-Höhen können uneinheitlicher erscheinen.
3. Verschiedenen Instrumente können für die gleiche Probe unterschiedliche relative Fluoreszenzeinheiten messen. Außerdem unterscheiden sich unterschiedliche Instrumente in der relativen Effizienz der Farbdetektion, die sich auf die Balance zwischen den Farben auswirkt.

6.L. Probenanalyse mit der GeneScan® Software und Macintosh® Betriebssystemen

1. Analysieren von Daten mit der GeneScan® Analysis Software
2. Prüfen Sie die Rohdaten für einen oder mehrere Probenläufe. Markieren Sie den Namen der Probe und wählen Sie dann „Raw Data“ im Menü „Sample“. Ziehen Sie den Cursor, so dass sich das Fadenkreuz auf der Basislinie rechts des großen Primer-Peaks befindet (vor dem ersten Peak des internen Längenstandards [orange]). Verwenden Sie den X-Wert, der unten links im Fenster angezeigt wird, als Startposition in den Analyseparametern.
3. Die empfohlenen Analyseparameter sind:

Analysebereich	Start: Definiert in Schritt 2 Stopp: 10 000
Verarbeiten der Daten	Basislinie: Markiert Multi-Komponenten: Markiert Glättung: Leicht[1]
Maximum-Erkennung	Schwellenwert der Maximum-Amplitude[2]: B: 50 Y: 50 G: 50 R: 50 O: 50 Halbe Breite kleinstes Maximum: 2 pts
Bereich Größenaufruf	Min: 60 Max: 500
Methode des Größenaufrufs	Local Southern Method
Korrektur Doppelmaximum	Keine

[1] Smooth Options müssen von den Labors individuell bestimmt werden.

[2] Die Grenzwerte der Peak Amplitude Thresholds sind die kleinsten Peak-Höhen, die die Software als Peak deutet. Die Grenzwerte der Peak Amplitude Thresholds liegen gewöhnlich bei 50–150 RFU und müssen von Labors individuell bestimmt werden. Verwenden Sie 50 RFU als Grenzwert der Peak-Amplitude für CC5.

4. Die Analyseparameter können im Ordner „Params“ gespeichert werden.
5. Wenden Sie die gespeicherte Analyseparameterdatei auf die Proben an.
6. Definieren Sie einen neuen Längenstandard. Wählen Sie einen Probenlauf aus, markieren Sie den Pfeil neben dem Längenstandard und wählen Sie „define new“. Beschriften Sie die Längenstandard-Peaks mit 60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 375, 400, 425, 450, 475 und 500 Basen. Speichern Sie den Längen-standard im Ordner „Size Standards“.

6.L. Probenanalyse mit der GeneScan® Software und Macintosh® Betriebssystemen (Fortsetzung)

7. Wenden Sie den definierten „Size Standard“ auf die Proben an, und analysieren Sie dann die Proben. In Abschnitt 6.M finden Sie zusätzliche Informationen über den Gebrauch der PowerTyper™ ESX 17 Macro und Genotyper® Software.

   Weitere Informationen über die GeneScan® Analysis Software finden Sie im *Benutzerhandbuch für die GeneScan® Analysis Software*.

Hinweise:

1. Peak-Höhen außerhalb des linearen Bereichs des Instruments können Artefakt-Peaks aufgrund von Instrumentensättigung (d. h. Überladen der Probe) sein. Es kann zur Überstrahlung (Pull-Ups) von einer Farbe durch eine andere kommen. Gesättigte Signale können auch als Doppel-Peak (Split Peak) auftreten.
2. Wenn sich die Peak-Höhen nicht im linearen Detektionsbereich des Instruments befinden, nimmt das Verhältnis von Stutter-Peaks zu tatsächlichen Allel-Peaks zu, und die Interpretation von Profilen wird schwierig.
3. Verschiedenen Instrumente können für die gleiche Probe unterschiedliche relative Fluoreszenzeinheiten messen. Außerdem unterscheiden sich unterschiedliche Instrumente in der relativen Effizienz der Farbdetektion, die sich auf die Balance zwischen den Farben auswirkt.

6.M. Probenanalyse mit der Genotyper® Software und dem PowerTyper™ ESX 17 Macro

Zur leichteren Analyse der mit dem PowerPlex® ESX 17 System generierten Daten, haben wir eine Datei erstellt, die die automatische Zuweisung von Genotypen mit der Genotyper® Software ermöglicht. Nach der Amplifikation der Proben, der Detektion mit dem ABI PRISM® 310 oder 3100 Genetic Analyzer und der Analyse mit der GeneScan® Analysis Software, können Probedateien in das Genotyper® Programm importiert und anhand des PowerTyper™ ESX 17 Macros analysiert werden.

Die PowerTyper™ ESX Macros können hier heruntergeladen werden:
www.promega.com/geneticidtools/powertyper/

Das PowerTyper™ ESX 17 Macro wird zusammen mit der Macintosh® Genotyper® Software, Version 2.5 und der Windows NT® Genotyper® Software, Version 3.6, oder später verwendet. Die Genotyper® Software muss auf Ihrem Computer installiert sein bevor das PowerTyper™ ESX 17 Macro verwendet werden kann.

Bei der Allelleiter muss in der Spalte „Sample Info“ (Macintosh® Computer) oder „Color Info“ (Windows NT® Betriebssysteme), das Wort „ladder“ eingegeben werden. Das Macro benötigt das Wort „ladder“, um Allelleitern zu erkennen. Informationen über die Proben können nach dem Import in das PowerTyper™ ESX 17 Macro hinzugefügt oder geändert werden. Markieren Sie die Probe und wählen Sie dann „show dye/lanes window“ im Menü „Views“.

1. Speichern Sie das PowerTyper_ESX_17 Macro auf der Festplatte Ihres Computers ab.

2. Öffnen Sie die Genotyper® Software und dann das PowerTyper_ESX_17 Macro. Fragen zur Genotyper® Software werden im *Benutzerhandbuch für die Genotyper® Analysis Software* beantwortet.

3. Wählen Sie im Menü „File“ die Option „Import“ und importieren Sie das GeneScan® Projekt oder die Probenläufe, die analysiert werden sollen. Importieren Sie Fluorescein, JOE, TMR-ET, CXR-ET und CC5.

   Hinweis: Um die Farben zu wählen, die importiert werden sollen, wählen Sie „Set Preferences“ im Menü „Edit“.

4. Doppelklicken Sie auf das Macro „Check ILS“. Die Macros werden in der Ecke unten links im aktiven Fenster aufgeführt. Ein „Plots“ Fenster wird angezeigt und zeigt den internen Längenstandard (d. h. CC5 ILS 500) im Kanal CC5 (orange). Scrollen Sie nach unten, um die Fragmentlängen des internen Längenstandards zu prüfen und zu bestätigen. Analysieren Sie die Proben erneut mit der GeneScan® Software, falls notwendig, und definieren Sie die Fragmente des internen Längenstandards erneut.

   Hinweise:

   1. Die Software verwendet eine Allelleiter, um Allellängen zu bestimmen. Das Macro verwendet die erste Allelleiter, die für Allelbenennungen importiert wurde.
   2. Die Macintosh® Version der Genotyper® Software zeigt die Fragmentlängen für den internen Längenstandard an. Sie zeigt jedoch die Rohdaten für das Elektropherogramm anstelle der analysierten Daten.

5. Doppelklicken Sie für Spurenanalysen auf das Macro „POWER“. Das Macro „POWER“ zieht Allele in der Allelleiter heran, um Offsets für alle Loci zu berechnen. Dieser Prozess kann einige Minuten in Anspruch nehmen. Nach Beendigung wird ein „Plots“-Fenster geöffnet, in dem die Allelleitern angezeigt werden (d. h. D18S51, D21S11, TH01, D3S1358 und Amelogenin).

   Alternativ können Sie zur Datenbank- oder für Vaterschaftsanalyse auf das POWER 20 % Filter-Macro doppelklicken. Der Filter „POWER 20 %“ darf nicht verwendet werden, wenn eventuell DNA Mischspuren vorliegen.

6.M. Probenanalyse mit der Genotyper® Software und PowerTyper™ ESX 17 Macro (Fortsetzung)

6. Doppelklicken Sie auf das Macro „Allelic Ladders“. Ein Plot-Fenster wird geöffnet und zeigt die Fluorescein-Allelleitern (d. h. D18S51, D21S11, TH01, D3S1358 und Amelogenin), die JOE-Allelleitern (d. h. D16S539, D2S1338, D1S1656 und D10S1248), die TMR-ET-Allelleitern (d. h. FGA, D8S1179, vWA und D22S1045) und die CXR-ET-Allelleitern (d. h. SE33, D19S433, D12S391 und D2S441) an. Bestätigen Sie, dass den Allelleitern die richtigen Allelbenennungen zugeordnet wurden (Abbildung 24 in Abschnitt 6.O und Tabelle 3 in Abschnitt 9.A).

   Die Software verwendet eine Leiterprobe, um Allellängen zu bestimmen. Das Macro verwendet die erste Leiterprobe, die für Allelbenennungen importiert wurde. Wenn das POWER Macro ein zweites Mal durchgeführt wird, verwendet die Software die zweite Leiter; wenn das POWER Macro ein drittes Mal durchgeführt wird, verwendet die Software die dritte Leiter usw. bis alle Leitern im Projekt verwendet wurden. Wenn eine Allelleiter nicht analysiert wird, oder wenn viele Off-Ladder-Allele in der Probe festgestellt werden, müssen die Proben anhand einer anderen Leiter aus dem Projekt erneut analysiert werden.

   Hinweis: Die FGA-Allele 50.2 und 48.2 weisen hohe Stutter-Werte auf. Das PowerTyper™ ESX 17 Macro kennzeichnet diese Stutter-Peaks als Allele 49.2 und 47.2.

7. Doppelklicken Sie auf das Macro „Display Blue Data“, um die Fluorescein-Daten für alle Probeninjektionen anzuzeigen. Scrollen Sie nach unten, um die Daten anzusehen oder bei Bedarf zu bearbeiten.

8. Doppelklicken Sie auf das Macro „Display Green Data“, um die JOE-Daten für alle Probeninjektionen anzuzeigen. Scrollen Sie nach unten, um die Daten anzusehen oder bei Bedarf zu bearbeiten.

9. Doppelklicken Sie auf das Macro „Display Yellow Data“, um die TMR-ET-Daten für alle Probeninjektionen anzuzeigen. Scrollen Sie nach unten, um die Daten anzusehen oder bei Bedarf zu bearbeiten.

10. Doppelklicken Sie auf das Macro „Display Red Data“, um die CXR-ET Daten für alle Probeninjektionen anzuzeigen. Scrollen Sie nach unten, um die Daten anzusehen oder bei Bedarf zu bearbeiten.

11. Erstellen Sie die entsprechende Tabelle, indem Sie den PowerTable, den Make Allele Table oder den Make CODIS Table Makro auswählen. Die drei verfügbaren Tabellenformate werden unten gezeigt. Die Option „PowerTable“ ermöglicht die Auflistung von bis zu vier Allelen pro Probe. Es werden auch zusätzliche Informationen wie „Low Peak Signal“ oder „High Peak Signal“ angezeigt. Die Tabellentypen „Allele Table“ und „CODIS Table“ umfassen nur zwei Allele pro Locus. Wenn mehr als zwei Allele an einem Locus vorhanden sind, werden die kleinsten festgestellten Allele berücksichtigt. Das Format „Allele Table“ zeigt die Kategorien (Loci) in Spalten an, während die Kategorien im Format „CODIS Table“ in

Zeilen angezeigt werden. Diese Tabellen können nach Bedarf angepasst werden. Um Daten in Tabellen zu speichern, gehen Sie zum Dropdown-Menü „Table“ markieren Sie „Export to File...“, und speichern Sie die Datei am gewünschten Ort mit dem gewünschten Namen. Die gespeicherte Datei kann in Microsoft® Excel angezeigt und analysiert werden.

12. Speichern Sie die analysierten Daten. Gehen Sie zum Menü „File“ und wählen Sie „Save as“.

Das PowerTyper™ ESX 17 Macro ist eine Genotyper® Datei und kann überschrieben werden, wenn Sie „Save“ anstelle von „Save as“ verwenden.

Format PowerTable

Sample Info	Sample Comment	Category	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Over-flow	Low Signal	Satura-tion	Edited Label	Edited Row

Format Allel-Tabelle

Sample Info	Category Allele 1	Category Allele 2	Category Allele 1	Category Allele 2	Category Allele 1	Category Allele 2	Category Allele 1	Category Allele 2

Format CODIS-Tabelle

Sample Info	Category	Peak 1	Peak 2

6.N. Kontrollen

1. Prüfen Sie die Ergebnisse für die Negativkontrolle. Wenn die in diesem Handbuch beschriebenen Protokolle verwendet wurden, sollte die Negativkontrolle frei von Amplifikationsprodukten sein.
2. Prüfen Sie die Ergebnisse für die 9947A-DNA (Positivkontrolle). Vergleichen Sie die Repeatlängen der Allele der 9947A-DNA mit der Locus-spezifischen Allelleiter. Die erwarteten Allelbenennungen der 9947A-DNA für jeden Locus sind in Tabelle 4 (Abschnitt 9.A) aufgeführt. Die Zelllinien-DNA 9947A weist allelische Imbalance und Imbalance zwischen STR-Loci auf.

6.O. Ergebnisse

Ein repräsentatives Ergebnis des PowerPlex® ESX 17 Systems wird in Abbildung 23 gezeigt. Die PowerPlex® ESX 17 Allelleiter wird in Abbildung 24 gezeigt.

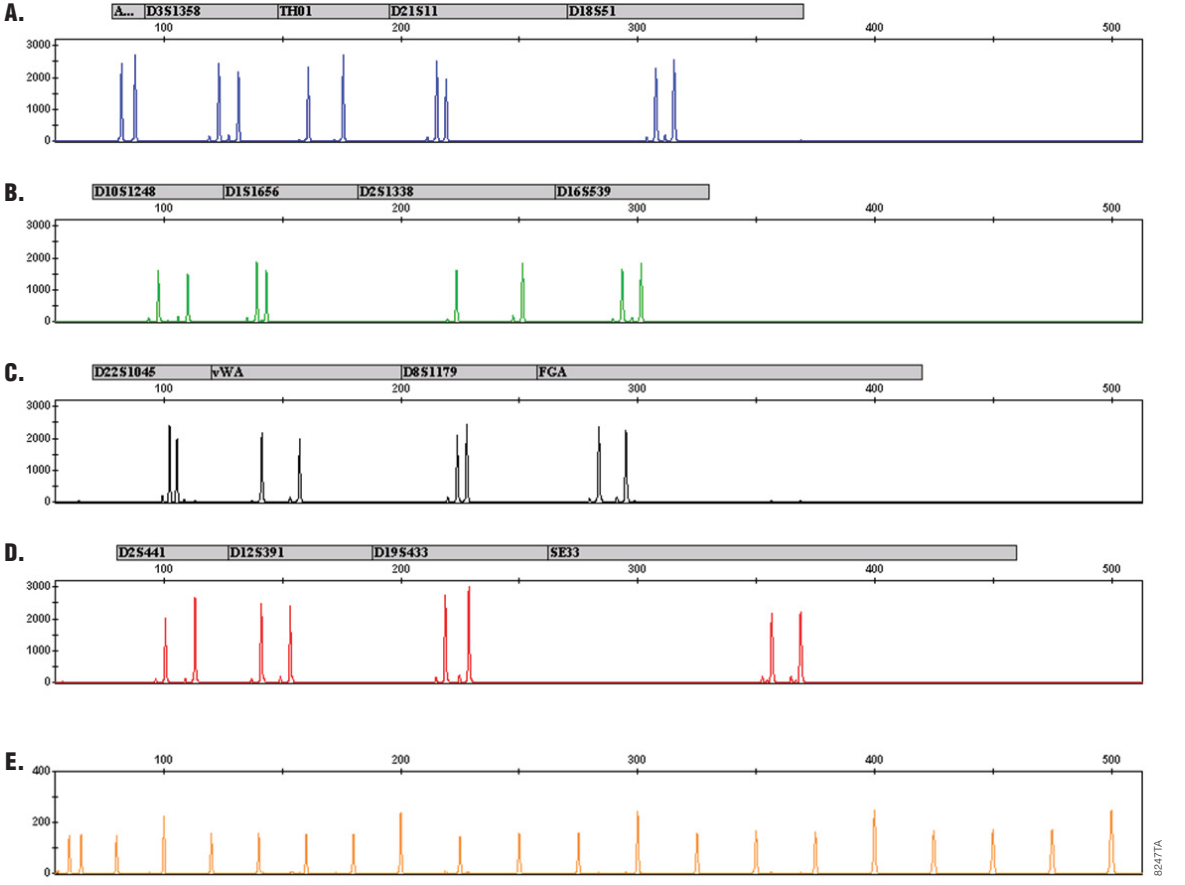

Abbildung 23. PowerPlex® ESX 17 System. Eine Template-DNA (0,5 ng) wurde mit dem PowerPlex® ESX 17 10X Primer Pair Mix amplifiziert. Die Amplifikationsprodukte wurden mit dem CC5 Internal Lane Standard 500 gemischt und mit einem Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer mit einer Injektion von 3 kV und 5 Sekunden aufgetrennt. Die Daten wurden mit der GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2 analysiert. **Panel A.** Das Elektropherogramm zeigt die Peaks der mit Fluorescein markierten Loci: Amelogenin, D3S1358, TH01, D21S11 und D18S51. **Panel B.** Das Elektropherogramm zeigt die Peaks der mit JOE markierten Loci: D10S1248, D1S1656, D2S1338 und D16S539. **Panel C.** Das Elektropherogramm zeigt die Peaks der mit TMR-ET markierten Loci: D22S1045, vWA, D8S1179 und FGA. **Panel D.** Das Elektropherogramm zeigt die Peaks der mit CXR-ET markierten Loci: D2S441, D12S391, D19S433 und SE33. **Panel E.** Das Elektropherogramm zeigt die 60 bp bis 500 bp Fragmente des CC5 Internal Lane Standard 500.

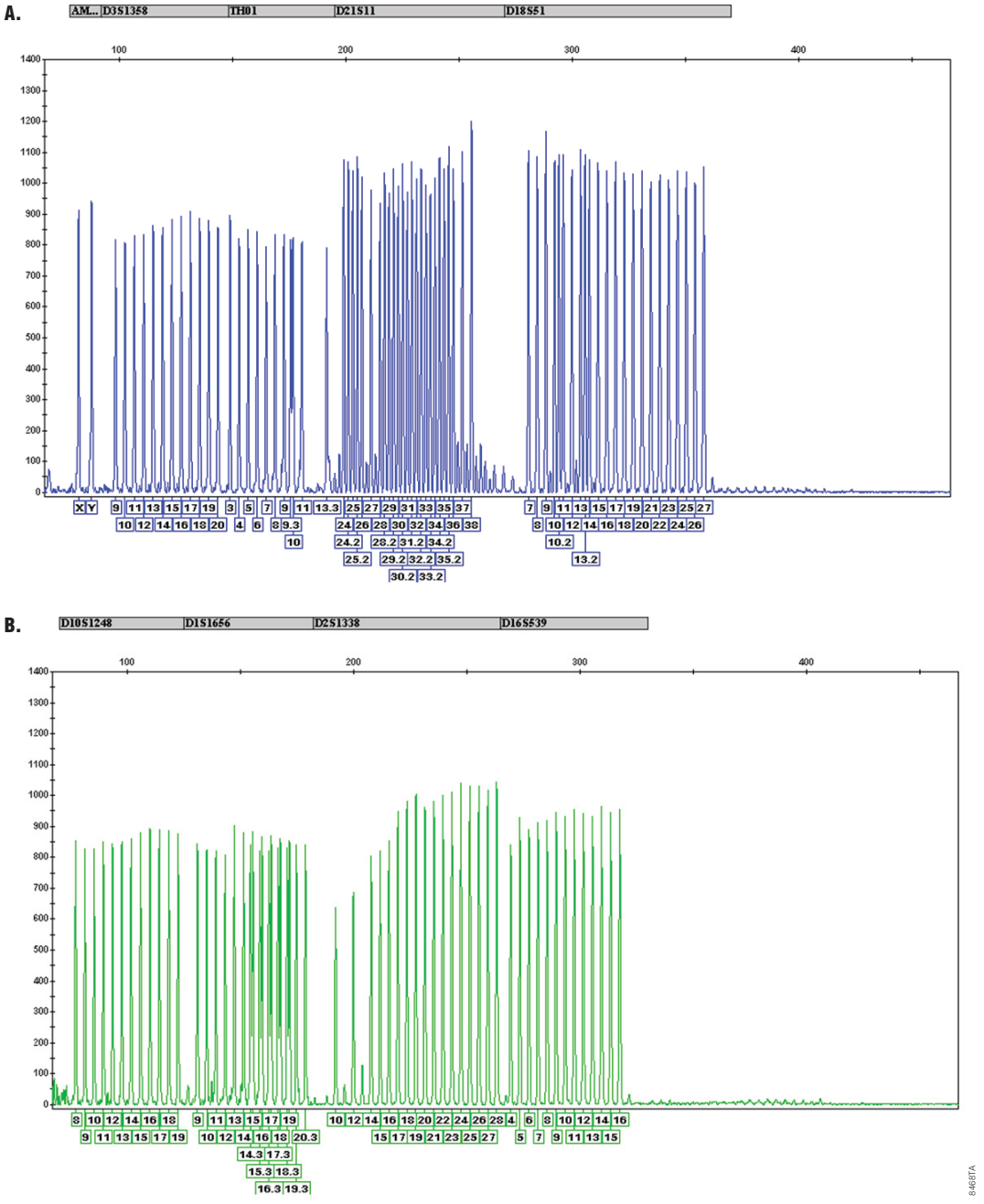

Abbildung 24. PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix. Das PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix wurde mit einem Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer mit einer Injektion von 3 kV und 5 Sekunden aufgetrennt. Die Proben wurden mit der GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2 und PowerPlex® ESX Panel und Bin Dateien analysiert. **Panel A.** Die mit Fluorescein markierten Allelleiterkomponenten und deren Allelbenennungen. **Panel B.** Die mit JOE markierten Allelleiterkomponenten und deren Allelbenennungen. **Hinweis:** Panel C und D werden auf den nächsten Seite gezeigt.

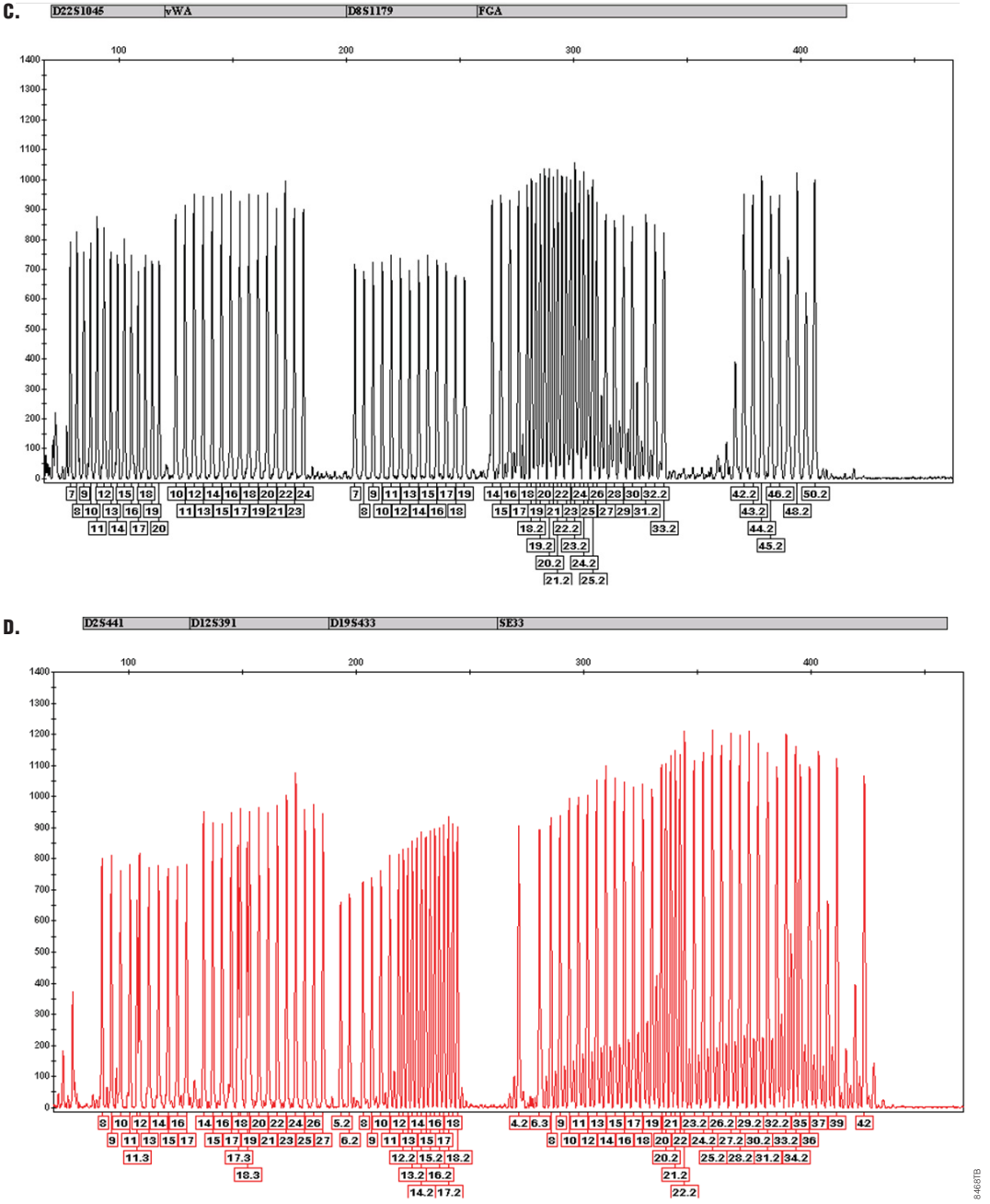

Abbildung 24. PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix (Fortsetzung). Das PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix wurde mit einem Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer mit einer Injektion von 3 kV und 5-Sekunden aufgetrennt. Die Proben wurden mit der GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2 und PowerPlex® ESX Panel und Bin Dateien analysiert. **Panel C.** Die mit TMR-ET markierten Allelleiterkomponenten und deren Allelbenennungen. **Panel D.** Die mit CXR-ET markierten Allelleiterkomponenten und deren Allelbenennungen. **Hinweis:** Panel A und B werden auf der vorhergehenden Seite gezeigt.

Artefakte und Stutter

Stutter-Banden sind ein häufiges Amplifikations-Artefakt im Zusammenhang mit STR-Analysen (14,15). Stutter-Produkte sind meist um eine Repeat-Einheit kürzer als das tatsächliche Allel. Gelegentlich sind sie aber auch zwei Repeat-Einheiten kürzer oder eine Repeat-Einheit länger als das tatsächliche Allel. Oft zeigen Allele mit vielen Repeat-Einheiten einen höheren Stutter-Anteil. Das Muster und die Intensität von Stuttern kann für die gleichen Loci bei unter-schiedlichen Primer-Sets leicht unterschiedlich sein. Erhöhter Stutter steht oft mit D22S1045 in Zusammenhang, da es sich um einen Trinukleotid-Repeatmarker handelt.

In den PowerPlex® ESX Panel-Dateien zu Locus-spezifischem Filtern in der GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2, GeneMapper® *ID*-X Software und dem PowerTyper™ ESX 17 Macro für die Genotyper® Software wird der jeweils höchste beobachtete Stutter jedes Locus verwendet.

Zusätzlich zu den Stutter-Peaks können mit den PowerPlex® ESX 17 System Loci die folgenden schwachen Artefakt-Peaks beobachtet werden.

Loci	Instrument	Artefaktgrößen[1]
D21S11, D2S441, D1S1656 und SE33	ABI PRISM® 310 und Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer	n–2; n+2[2]
Amelogenin	ABI PRISM® 310 und Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer	n–1[3]
		65–71 Basen Das Artefakt wandert schneller als Amelogenin
	nur ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer	72–73 Basen (männliche und weibliche Proben)[4]
		77–78 Basen (nur männliche Proben)[4]
	nur Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer	76 Basen (männliche und weibliche Proben)[4]
		85 Basen (nur männliche Proben)[4]
D10S1248	ABI PRISM® 310 und Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer	60–64 Basen Das Artefakt wandert schneller als D10S1248[5]

[1] Die hier aufgeführten Artefakte sind DNA-abhängig.

[2] Jeweils zwei Basen kürzer und länger als das tatsächliche Allel.

[3] Das n–1 Artefakt ist mit hohen Eingabemengen von Template und großen Peak-Höhen der Allele besser erkennbar.

[4] Diese Peaks mit variabler Höhe auf dem ABI PRISM® 310 und Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer können doppelsträngige DNA sein, die vom Amelogenin-Amplicon stammt (doppelsträngige DNA wandert in Kapillarelektrophorese-Instrumenten bekanntermaßen schneller als einzelsträngige DNA). Dieses Artefakt wird nur bei hohen Maxima für die X- und Y-Allel festgestellt.

[5] Schwaches, von DNA abhängiges Artefakt ist nur mit hohen Eingabemengen von Template und großen Peak-Höhen der Allele erkennbar. Das Artefakt tritt ungefähr 13–17 Basen vor dem kleinsten Allel (Allel 8) in D10S1248 auf. Dieser Peak kann, abhängig von der Sensitivität des Instruments, über- oder unterhalb dem Grenzwert der Analyse liegen.

7. Fehlerbehebung

Wenn Sie Fragen haben, die hier nicht beantwortet werden, wenden Sie sich bitte an Ihre zuständige Promega-Niederlassung oder Vertriebsstelle. Kontaktinformationen erhalten sie unter: **www.promega.com**. E-Mail: **genetic@promega.com**

7.A Amplifikation und Fragmentdetektion

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Schwache oder fehlende Allel-Peaks	Verunreinigte Template-DNA. Da nur geringe Mengen Template verwendet werden, ist dies nur selten ein Problem. Abhängig von dem verwendeten DNA-Extraktionsverfahren und der Probenquelle können in der DNA-Probe Inhibitoren vorhanden sein.
	Unzureichende Template-Menge. Verwenden Sie die empfohlene Menge an Template-DNA, soweit vorhanden.
	Unzureichende Template-Menge. Low-Copy-Number (LCN)-Analyse unter Verwendung von Kapillarelektrophorese kann davon profitieren, dass konkurrierende geladene Partikeln während der Injektion reduziert werden. Dies kann durch Reinigung des PCR-Produktes oder Entsalzen, Formamid mit geringerer Leitfähigkeit oder reduzierten Mengen von CC5 ILS 500 erfolgen. Für alle diese Methoden sollte eine laborinterne Validierung durchgeführt werden.
	Das PowerPlex® ESX 5X Master Mix war vor dem Gebrauch nicht gut gevortext. Vortexen Sie das 5X Master Mix 5–10 Sekunden lang, bevor es in das PCR Amplifikationsgemisch gegeben wird.
	Hohe Salzkonzentrationen oder veränderter pH-Wert. Wenn das DNA-Template im TE-Puffer gelagert wird, der einen höheren pH-Wert als 8,0 hat oder eine höhere EDTA-Konzentration enthält, darf das DNA-Volumen 20 % des Gesamtreaktionsvolumens nicht überschreiten. Übertrag von K^+, Na^+, Mg^{2+} oder EDTA von der DNA-Probe kann die PCR negativ beeinflussen. Ein veränderter pH-Wert kann ebenfalls die PCR beeinflussen. Lagern Sie die DNA in TE^{-4} Puffer (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 0,1 mM EDTA) oder nuklease-freiem Wasser.
	Probleme mit dem Thermocycler, der Platte oder den Röhrchen. Ziehen Sie die Protokolle für das Thermocycling in Abschnitt 4.B zu Hilfe. Andere Reaktionsröhrchen, Platten oder Thermocycler wurden von uns nicht getestet. Kalibrieren Sie den Heizblock des Thermocyclers, falls notwendig.
	Die Primerkonzentration war zu niedrig. Verwenden Sie die empfohlene Primerkonzentration. Vortexen Sie die PowerPlex® ESX 17 10X Primerpaare vor dem Gebrauch 15 Sekunden lang.
	Schlechte Injektion bei der Kapillarelektrophorese (CC5 ILS 500 Peaks sind auch betroffen). Injizieren Sie die Probe erneut. Prüfen Sie, ob die Spritze undicht ist. Prüfen Sie die Leistung des Lasers.

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Schwache oder fehlende Allel-Peaks (Fortsetzung)	Die Proben wurden nicht vollständig denaturiert. Denaturieren Sie die Proben direkt vor dem Laden für den empfohlenen Zeitraum durch Erhitzen und kühlen Sie sie sofort auf Eis oder im Eiswasserbad ab. Kühlen Sie die Proben nicht in einem Thermocycler, der auf 4 °C eingestellt ist, da dies aufgrund von Re-Annealings zu Artefakten führen kann.
	Es wurde Formamid von schlechter Qualität verwendet. Verwenden Sie zum Analysieren der Proben nur Hi-Di™ Formamid.
In einem oder allen Farbkanälen sind zusätzliche Peaks sichtbar	Kontamination mit einer anderen Template-DNA oder zuvor amplifizierter DNA. Kreuzkontamination kann ein Problem sein. Verwenden Sie gegen Aerosol geschützte Pipettenspitzen und wechseln Sie die Handschuhe häufig.
	Die Proben wurden nicht vollständig denaturiert. Denaturieren Sie die Proben direkt vor dem Beladen für den empfohlenen Zeitraum durch Erhitzen und kühlen Sie sie sofort danach auf Eis oder im Eiswasserbad ab.
	Doppelsträngige DNA wandert während der Kapillarelektrophorese schneller als einzelsträngige DNA. „Schatten"-Peaks, die vor den Hauptpeaks auftreten, können durch doppelsträngige DNA aufgrund unvollständigen Denaturierens oder Re-Annealings nach der Injektion verursacht sein. Dies trifft insbesondere dann zu, wenn die Schatten-Peaks in einem heterozygoten Profil, mit der gleichen Entfernung voneinander getrennt vorliegen wie die beiden Hauptpeaks.
	Artefakte der STR-Amplifikation. Die Amplifikation von > 0,5 ng Template kann zu einer höheren Anzahl von Artefakt-Peaks führen. Verwenden Sie weniger DNA. Siehe Abschnitt 6.O für weitere Informationen über Stutter und Artefakte.
	Artefakte der STR-Amplifikation. Unvollständige Adenylierung, kann zu Artefakten während der PCR-Amplifikation von STR-Systemen führen. Diese erscheinen als Peaks, die eine Base kürzer als die Allele sind. Achten Sie darauf, dass der 45-minütige „Extension"-Schritt nach dem Thermocycling bei 60 °C durchgeführt wird (Abschnitt 4.B).
	CE-bedingte Artefakte („Spikes"). Geringe Spannungsänderungen oder Ureakristalle, die das Laserfenster passieren, können „Spikes" oder unerwartete Peaks verursachen. Spikes erscheinen manchmal nur in einer Farbe, können jedoch oft leicht daran erkannt werden, dass sie in allen Farben auftreten. Injizieren Sie die Proben erneut.
	Die falsche G5 Matrix war aktiviert. Trennen Sie die Probe erneut auf und vergewissern Sie sich, dass die PowerPlex® 5-Dye G5 Matrix aktiviert ist. Siehe Anweisungen zur Vorbereitung des Instruments in Abschnitt 5.

7.A. Amplifikation und Fragmentdetektion (Fortsetzung)

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
In einem oder allen Farbkanälen sind zusätzliche Peaks sichtbar (Fortsetzung)	Pull-Up oder Überstrahlung. Pull-Up kann auftreten, wenn Peaks zu hoch sind oder wenn eine schlechte oder falsche Matrix auf die Proben angewendet wird. • Erstellen Sie auf dem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer eine neue Matrix und wenden Sie sie auf die Proben an. Führen Sie auf den ABI PRISM® 3100 und 3100-*Avant* Genetic Analyzers und Applied Biosystems 3130, 3130*xl*, 3500 und 3500xL Genetic Analyzers eine neue Spektralkalibrierung durch und wenden Sie diese auf die Proben an. • Verschiedene Instrumente können unterschiedliche Empfindlichkeiten haben. Optimieren Sie die Injektionsbedingungen. Siehe Abschnitt 5.
	CE-bedingte Artefakte (Verunreinigungen). Verunreinigungen im Wasser, das mit dem Instrument oder zum Verdünnen der 10X Genetic Analyzer Puffer verwendet wird, können Peaks im Fluorescein- und JOE-Kanal erzeugen. Verwenden Sie autoklaviertes Wasser, wechseln Sie die Fläschchen und waschen Sie das Pufferreservoir.
	Wiederholen Sie die Probenvorbereitung mit frischem Formamid. Langfristige Lagerung amplifizierter Proben in Formamid kann diese zersetzen.
	Das Verfallsdatum für das CE-Polymer war abgelaufen, oder das Polymer wurde länger als eine Woche bei Raumtemperatur gelagert.
	Die Instrumente nach Empfehlung des Herstellers täglich oder wöchentlich warten.
Die Allelleiter läuft nicht so wie die Proben	Die Allelleiter und das Primerpaargemisch waren nicht kompatibel. Achten Sie darauf, dass die Allelleiter von dem gleichen Kit ist, wie das Primerpaargemisch.
	Formamid schlechter Qualität. Verwenden Sie zum Analysieren der Proben nur Hi-Di™ Formamid.
	Achten Sie darauf, dass die Allelleiter und die Proben aus dem gleichen Instrumentenlauf stammen.
	Die Migration der Proben hat sich während eines CE-Laufs mit vielen Proben leicht geändert. Dies kann auf Temperaturänderungen oder Veränderungen der Kapillare im Verlauf der Zeit zurückzuführen sein. Verwenden Sie eine andere Injektion der Allelleiter, um die Allellängen zu bestimmen.
	Schlechte Injektion der Allelleiter. Verwenden Sie mehrere Leitern pro Instrumentenlauf.

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Unbalancierte Peakhöhen	Zu hohe DNA-Menge. Die Amplifikation von mehr als 0,5 ng Template kann zu einem Ungleichgewicht führen, wobei kürzere Loci höhere Peaks aufweisen als längere Loci. Verwenden Sie weniger Template.
	Verwendung von FTA® Papier. Die Ergebnisse können denen ähneln, die mit zu hohen Mengen DNA erzielten wurden. Verwenden Sie weniger Zyklen.
	Degradierte DNA-Probe. DNA-Template war degradiert und größere Loci zeigten eine geringere Ausbeute. Template-DNA erneut aufreinigen.
	Template-DNA reicht nicht aus. Verwenden Sie die empfohlene Menge an Template-DNA, soweit vorhanden. Es kann zu stochastischen Effekten kommen, wenn geringe Mengen Templates amplifiziert werden.
	Verschiedene Balance-Probleme. Tauen Sie das 10X Primer Pair Mix und 5X Master Mix vor dem Gebrauch vollständig auf und vortexen Sie es 15 Sekunden lang. Zentrifugieren Sie das 10X Primer Pair Mix nach dem Mischen nicht. Kalibrieren Sie die Thermocycler und Pipetten regelmäßig .
	Das in Abschnitt 4.A vorbereitete PCR Amplifikationsgemisch wurde nicht ausreichend gemischt. Vortexen Sie das PCR Amplifikationsgemisch 5–10 Sekunden lang, bevor es in die Reaktionsröhrchen oder -platte gegeben wird.
	Verunreinigte Template-DNA. In Spurenmaterial vorhandene Inhibitoren können zu Allel-Dropout oder Imbalance führen.

7.B GeneMapper® *ID*-X Software

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Stotter-Peaks werden nicht gefiltert	Die Stotter-Dateien wurden nicht in den Panel Manager importiert als die Panel- und Bin-Dateien importiert wurden.
	Die „Stutter-Distance“ wurde in der Registerkarte „Allele“ in der Analysis Methode nicht definiert.
Proben des Projektes werden nicht analysiert	Das Fenster „Analysis Requirement Summary“ war nicht aktiv und eine Analysebedingung wurde nicht eingehalten. Aktivieren Sie unter „Options“ das „Analysis Requirement Summary“ und korrigieren Sie die notwendigen Analysebedingungen, um mit der Analyse fortzufahren.
Änderungen in der Label Edit Ansicht sind nicht sichtbar	Um Änderungen an einem Projekt sehen zu können, muss das Projekt erst gespeichert werden. Schließen Sie das Fenster „Plot View“, gehen Sie zurück zur Hauptseite des GeneMapper® *ID*-X und speichern Sie das Projekt. Lassen Sie sich das Fenster „Plot View“ erneut anzeigen, um die Tabelle „Label Edit“ zu sehen.
Die Marker-Kopfzeilen mancher Loci sind grau	Wenn Änderungen an einem Locus vorgenommen werden, werden Quality Flags und Marker-Kopfzeilen automatisch grau eingefärbt. Um die GQ und Marker-Kopfzeilen für einen Locus auf grün zu ändern, überschreiben Sie die GQ im Plot-Fenster.

7.B GeneMapper® *ID-X* Software (Fortsetzung)

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Allele werden nicht erkannt	Um Proben mit der GeneMapper® *ID* Software zu analysieren, muss mindestens eine Allelleiter definiert sein.
	Die Anzahl der definierten CC5 ILS 500 Fragmente ist unzureichend. Achten Sie darauf, dass Sie mindestens ein CC5 ILS 500 Fragment bestimmen, das kleiner ist als der kleinste Proben-Peak und mindestens ein CC5 ILS 500 Fragment, das größer ist als der größte Probenpeak. In diesem Fall hätte die Allelleiter den Qualitätscheck nicht bestanden.
	Der Lauf war zu kurz und längere Fragmente im ILS wurden nicht erfasst. Nicht alle definierten Längenstandard CC5 ILS 500 Fragmente wurden während des Laufs festgestellt. • Erstellen Sie einen neuen Längenstandard mit den internen Längenstandardfragmente, die in der Probe vorhanden sind. • Trennen Sie die Proben mit einer längeren Laufzeit erneut auf.
	Eine Allelleiter mit geringer Qualität wurde für die Analyse verwendet. Stellen Sie sicher, dass nur hochwertige Allelleiter für die Analyse eingesetzt werden.
Off-Ladder Allele	Eine Allelleiter wurde verwendet, die nicht zu dem Lauf der der Proben gehört. Analysieren Sie die Proben mit einer Allelleiter vom gleichen Lauf erneut. Die GeneMapper® *ID* Software erfordert, dass die Allelleiter aus dem gleichen Ordner wie die Probe importiert wird. Stellen Sie sicher, dass sich die Allelleiter im selben Ordner wie die Probe befindet.
	Die für die Analyse gewählte Panel-Datei, war für das verwendete STR-System nicht geeignet. Ordnen Sie die richtige Panel-Datei für das STR-System zu, das für die Amplifikation verwendet wurde.
	Die Allelleiter wurde in der Spalte „Sample Type“ nicht als Allelleiter gekennzeichnet.
	In der Probe wurde der interne Längenstandard nicht richtig erkannt. Definieren Sie manuell die Längen der Längenstandardfragmente.
	Eine Allelleiter mit geringer Qualität wurde für die Analyse verwendet. Stellen Sie sicher, dass nurhochwertige Allelleiter für die Analyse eingesetzt werden.
Der Längenstandard wird nicht richtig erkannt	Der Startdatenpunkt für den in Abschnitt 6.E gewählten Teilbereich war nicht korrekt. Ändern Sie den Startdatenpunkt in der Analysemethode. Alternativ dazu können Sie den vollen Bereich für die Analyse verwenden.
	Zusätzliche Peaks im Längenstandard. Öffnen Sie den Size Match Editor. Markieren Sie den zusätzlichen Peak, wählen Sie „Edit“ und wählen Sie „delete size label“. Wählen Sie „auto adjust sizes“.
	Der Lauf war zu kurz und längere Fragmente im ILS wurden nicht erfasst. Nicht alle im Längenstandard definierte CC5 ILS 500 Peaks wurden während des Laufs festgestellt. • Erstellen Sie einen neuen Längenstandard mit den internen Längenstandardfragmente, die in der Probe vorhanden sind. • Lassen Sie die Proben mit einer längeren Laufzeit erneut laufen.

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Die Peaks im Längenstandard fehlen	Wenn Peaks unter der eingestellten „Peak Amplitude Threshold“ liegen, setzen Sie den Grenzwert in der Analysemethode für den orangen Kanal herunter, um die Peaks einzuschließen.
	Wenn Peaks von schlechter Qualität sind, definieren Sie den Längenstandard für die Probe neu, um diese Peaks zu überspringen.
Signifikant erhöhte Grundlinie	• Die Spektren der ABI PRISM® 3100 und 3100-*Avant* Genetic Analyzer und Applied Biosystems 3130, 3130*xl*, 3500 und 3500xL Genetic Analyzer sind schlecht kalibriert. Führen Sie die Spektralkalibrierung erneut durch und lassen Sie die Proben noch mal laufen. • Schlechte Matrix für den ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer. Lassen Sie die Matrix erneut laufen und optimieren Sie diese. Stellen Sie sicher, dass die 5-Dye-Matrix auf dem Gerät erstellt wird.
	Das falsche G5 Spektral war aktiv. Lassen Sie die Proben erneut laufen und stellen Sie sicher, dass das PowerPlex® 5-dye G5 Spektral auf G5 eingestellt ist. Die Anleitung dazu finden Sie in Abschnitt 5, Instrumenten-Setup.

7.C. GeneMapper® *ID* Analysis Software

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Allele werden nicht erkannt	Um Proben mit der GeneMapper® *ID* Software zu analysieren, muss sowohl für die Analyseparameter als auch für den Längenstandard der Analysetyp „Basic or Advanced“ ausgewählt sein. Sollten sie verschieden sein, wird ein Fehler hervorgerufen.
	Um Proben mit den GeneMapper® *ID* Software zu analysieren, muss wenigstens ein Allelic Ladder definiert sein.
	Die Anzahl der definierten CC5 ILS 500 Fragmente ist unzureichend. Achten Sie darauf, dass Sie mindestens ein CC5 ILS 500 Fragment bestimmen, das kleiner ist als der kleinste Proben-Peak und mindestens ein CC5 ILS 500 Fragment, das größer ist als der größte Probenpeak.
	Der Lauf war zu kurz und längere Fragmente im ILS wurden nicht erfasst. Nicht alle definierten Längenstandard CC5 ILS 500 Fragmente wurden während des Laufs festgestellt. • Erstellen Sie einen neuen Längenstandard mit den internen Längenstandardfragmente, die in der Probe vorhanden sind. • Trennen Sie die Proben mit einer längeren Laufzeit erneut auf.

7.C. GeneMapper® *ID* Analysis Software (Fortsetzung)

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Off-Ladder Allele	Eine Allelleiter wurde verwendet, die nicht zu dem Lauf der der Proben gehört. Analysieren Sie die Proben mit einer Allelleiter vom gleichen Lauf erneut.
	Die GeneMapper® *ID* Software erfordert, dass die Allelleiter aus dem gleichen Ordner wie die Probe importiert wird. Stellen Sie sicher, dass sich die Allelleiter im selben Ordner wie die Probe befindet. Erstellen Sie ein neues Projekt und analysieren Sie gemäß der Beschreibung in Abschnitt 6.I oder 6.J erneut.
	Die für die Analyse gewählte Panel-Datei, war für das verwendete STR-System nicht geeignet. Ordnen Sie die richtige Panel-Datei für das STR-System zu, das für die Amplifikation verwendet wurde.
	Die Allelleiter wurde in der Spalte „Sample Type“ nicht als Allelleiter gekennzeichnet.
	Für die Analysemethode wurde der falsche Analysetyp gewählt. Achten Sie darauf, dass der Analysetyp HID verwendet wird.
	In der Probe wurde der interne Längenstandard nicht richtig erkannt. Definieren Sie manuell die Längen der Längenstandardfragmente.
Der Längenstandard wird nicht richtig erkannt	Der Startdatenpunkt für den in Abschnitt 6.K gewählten Teilbereich war nicht korrekt. Ändern Sie den Startdatenpunkt in der Analysemethode. Alternativ dazu können Sie den vollen Bereich für die Analyse verwenden.
	Zusätzliche Peaks im Längenstandard (advanced mode). Öffnen Sie den Size Match Editor. Markieren Sie den zusätzlichen Peak, wählen Sie „Edit“ und wählen Sie „delete size label“. Wählen Sie „auto adjust sizes“.
	Der Lauf war zu kurz und längere Fragmente im ILS wurden nicht erfasst. Nicht alle im Längenstandard definierte CC5 ILS 500 Peaks wurden während des Laufs festgestellt. • Erstellen Sie einen neuen Längenstandard mit den internen Längenstandardfragmente, die in der Probe vorhanden sind. • Lassen Sie die Proben mit einer längeren Laufzeit erneut laufen.
Die Peaks im Längenstandard fehlen	Wenn Peaks unter der eingestellten „Peak Amplitude Threshold“ liegen, setzen Sie den Grenzwert in der Analysemethode für den orangen Kanal herunter, um die Peaks einzuschließen.
	Wenn Peaks von schlechter Qualität sind, definieren Sie den Längenstandard für die Probe neu, um diese Peaks zu überspringen.
Fehlermeldung „Either panel, size standard, or analysis method is invalid“	Der Längenstandard und die Analysemethode waren nicht im gleichen Modus („Classic“ vs. „Basic or Advanced“). Achten Sie darauf, dass beide Dateien auf den gleichen Modus eingestellt sind, entweder den Modus „Classic“ oder „Basic or Advanced“.

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Es werden keine Allelen erkannt, es wird jedoch keine Fehlermeldung angezeigt	Für die Probe wurde kein Panel ausgewählt. Wählen Sie in der Spalte „Panel" das zutreffende Panel-Set für das verwendete STR-System.
	Es wurde kein Längenstandard ausgewählt. Achten Sie darauf, dass Sie in der Spalte „Size Standard" den zutreffenden Längenstandard wählen.
	Der Längenstandard wurde nicht richtig definiert oder Längenstandard-Peaks fehlten. Definieren Sie den Längenstandard neu, indem nur Peaks benannt werden, die in Ihrer Probe vorhanden sind. Das vorzeitige Beenden der Analyse oder kurze Laufzeiten bewirken, dass längere Allelleiter-Peaks fehlen. Dadurch wird die Qualität Ihrer Längenzuordnung rot markiert, und es werden keine Allellängen erkannt.
Fehlermeldung: „Both the Bin Set used in the Analysis Method and the Panel must belong to the same Chemistry Kit"	Das der Analysemethode zugeordnete Bin Set wurde gelöscht. Wählen Sie im GeneMapper Manager die Registerkarte „Analysis Methods" und öffnen Sie die gewünschte Analysenmethode. Wählen Sie die Registerkarte „Allele" und dann das entsprechende Bin Set.
	In der Analysemethoden-Registerkarte „Allele" wurde das falsche Bin Set gewählt. Achten Sie darauf, dass das richtige Bin Set gewählt wird; siehe Abbildung 19.
Signifikant erhöhte Basislinie	• Schlechte Spektralkalibrierung für die ABI PRISM® 3100 und 3100-*Avant* Genetic Analyzers und Applied Biosystems 3130, 3130*xl*, 3500 und 3500xL Genetic Analyzers. Nehmen Sie eine neue Spektralkalibrierung vor und trennen Sie die Proben erneut auf. • Schlechte Matrix für den ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer. Erstellen Sie eine neue Matrix. Stellen Sie sicher, dass die verwendete Matrix auf dem selben Gerät erstellt wurde.
	Analysemethode im „Classic"-Modus verwendet. Das Anwenden des Modus „Classic" kann zu Basislinien mit höherem Rauschen führen, verglichen mit Analysen, die im Modus „Basic or Advanced" durchgeführt werden. Empfohlen werden Analysenmethoden und Längenstandards mit Verwendung des „Advanced" Modus.
	Das falsche G5 Spectral war aktiviert. Trennen Sie die Probe erneut auf und bestätigen Sie, dass der PowerPlex® 5-Dye G5 Spectral auf G5 eingestellt ist. Siehe Anweisungen zur Vorbereitung des Instruments in Abschnitt 5.
Während der Analyse der Proben erscheint ein roter Balken und die folgende Fehlermeldung erscheint, wenn Daten angezeigt werden: „Some selected sample(s) do not contain analysis data. Those sample(s) will not be shown"	Wenn beim Lauf mit dem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer auf keine der Proben eine Matrix angewendet wurde, werden keine Daten angezeigt. Wählen Sie für die Analyse der GeneMapper® *ID* Software eine Matrix aus und führen Sie die Analyse erneut durch.
Fehlermeldung nach dem Versuch, Panel und Bin Dateien zu importieren: „Unable to save panel data: java.SQLEException: ORA-00001: unique constraint (IFA.CKP_NNN) violated".	Es trat ein Konflikt zwischen verschiedenen Sets von Panel- und Bin-Dateien auf. Prüfen Sie, ob die Bins richtig installiert sind. Wenn nicht, löschen Sie alle Panel und Bin Sets und importieren Sie diese erneut.

7.C. GeneMapper® *ID* Analysis Software (Fortsetzung)

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Allelleiter-Peaks werden „Off-Ladder“ gekennzeichnet	Die GeneMapper® *ID* Software wurde nicht verwendet, oder es wurden Microsatellite-Analyseeinstellungen anstelle der HID-Analyseeinstellungen verwendet. Die GeneMapper® Software verwendet nicht die gleichen Algorithmen wie die GeneMapper® *ID* Software und kann Unterschiede in der Längenzuordnung nicht anhand der Allelleiter korrigieren. Promega empfiehlt die Verwendung der GeneMapper® *ID* Software zur Analyse von PowerPlex® Reaktionen. Wenn sie die GeneMapper® *ID* Software, Version 3.2, verwenden, müssen Sie darauf achten, dass die gewählte Analysemethode eine HID-Methode ist. Dies können Sie überprüfen, indem die Analysemethode mithilfe des GeneMapper Managers geöffnet und die Registerkarte „General“ gewählt wird. Der Analysetyp kann nicht geändert werden. Wenn die Methode nicht HID ist, muss sie gelöscht und eine neue Analysemethode erstellt werden.

7.D. PowerTyper™ ESX 17 Macro

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Die Datei wird auf Ihrem Computer nicht geöffnet	Genotyper® Software ist nicht installiert. Stellen Sie sicher, dass die Genotyper® Software, Version 2.5 (Macintosh®) oder Version 3.6 oder höher (Windows NT®), installiert ist.
	Falsche Version der Genotyper® Software. Das PowerTyper™ ESX 17 Macro kann nicht mit Genotyper® Software-Versionen ausgeführt werden, die älter als Version 2.5 (Macintosh®) oder 3.6 (Windows NT®) sind.
Fehlermeldung: „Could not complete the „Run Macro“ command because no dye/lanes are selected“	Es wurde keine Allelleiter gefunden. Achten Sie darauf, dass die Spalte „Sample Info“ oder „Color Info“ für jede Spur, die PowerPlex® ESX 17 Allelic Ladder Mix enthält, das Wort „ladder“ enthalten muss. Das Macro verwendet das Wort „ladder“, um Allelleitern zu erkennen.
	Es wurden nicht alle fünf Farbstoffe importiert. Stellen Sie für die Genotyper® Software, Versionen 2.5 und 3.6 oder höher, „Preferences“ (im Menü „Edit“) so ein, dass Fluorescein, JOE, TMR-ET, CXR-ET und CC5 Daten importiert werden.
Fehlermeldung: „Could not complete the „Run Macro“ command because the labeled peak could not be found“	In der Allelleiter-Probendatei waren Maximum-Amplituden für eine oder mehrere Allele unter 150 RFU. Die Allelleiterkategorien sind so definiert, dass sie eine minimale Peakhöhe von 150 RFU aufweisen müssen. Wenn die Peak-Höhen von Leiterallelen unter 150 RFU liegen, kann die Software die Allele nicht erkennen. Trennen Sie die Allelleiter noch einmal mit mehr Probenvolumen oder einer längeren Injektionszeit lauf, um Peak-Höhen von über 150 RFU zu gewährleisten.
	CE Spikes in der Allelleiter-Probe wurden vom Macro als Allele erkannt. Verwenden Sie eine andere Injektion der Allelleiter.
	Die Allelleiter-Daten waren mit der verwendeten PowerTyper™ Datei nicht kompatibel. Überprüfen Sie, dass die PowerTyper_ESX_17 Macro-Datei mit der verwendeten Allelleiter übereinstimmt.

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Fehlermeldung: „Could not complete the „Run Macro“ command because the labeled peak could not be found“ (Fortsetzung)	Die Basenpaarlängen von Allelen in der Allelleiter liegen außerhalb des definierten Kategoriebereichs. Achten Sie darauf, dass den internen Längenstandardfragmenten die richtige Länge zugeordnet ist. Definieren Sie die internen Längenstandardfragmente neu, und analysieren Sie die Probe erneut mit der GeneScan® Software. Vergleichen Sie die Länge des kleinsten Allels in der Allelleiter mit der Länge und dem Bereich der Basenpaare, die in den Kategorien für die gleichen Allele aufgeführt sind. Erhöhen Sie, falls nötig, den Startbereich der Kategorie (im Fenster „Category“) und speichern Sie das Macro unter einem anderen Namen.
	Die Allelleiter-Peaks waren zu hoch und verursachten, dass Stutter-Peaks als Allel-Peaks gedeutet wurden. Verwenden Sie eine kürzere Injektionszeit, verkleinern Sie die Menge verwendeter Allelleiter oder analysieren Sie die Allelleiterprobe erneut mit erhöhten Grenzwerten für die Peak Amplitude Thresholds in Parametern der GeneScan® Analyse.
	Die Allelleiter-Daten waren mit dem verwendeten PowerTyper_ESX_17 Macro nicht kompatibel. Bestätigen Sie, dass die PowerTyper_ESX_17 Macro-Datei mit der verwendeten Allelleiter übereinstimmt.
Die Tabelle „Plots Window“ oder „Allele“ zeigt nicht alle Daten an	Die Macros wurden nicht in der richtigen Reihenfolge ausgeführt. Verwenden Sie die Option POWER oder POWER 20% Filter Macro.
	Es wurden nicht alle fünf Farbstoffe importiert. Stellen Sie für die Genotyper® Software, Versionen 2.5 und 3.6 oder höher, „Preferences“ (im Menü „Edit“) so ein, dass Fluorescein, JOE, TMR-ET, CXR-ET und CC5 Daten importiert werden.
Das Macro „Check ILS“ zeigt ein leeres Plot-Fenster an	Es wurden nicht alle fünf Farbstoffe importiert. Stellen Sie für die Genotyper® Software, Versionen 2.5 und 3.6 oder höher, „Preferences“ (im Menü „Edit“) so ein, dass Fluorescein, JOE, TMR-ET, CXR-ET und CC5 Daten importiert werden.
Off-Ladder Peaks	Das Laufverhalten der Proben hat sich während eines CE-Laufs mit vielen Proben leicht geändert. Dies kann auf Temperaturänderungen oder Veränderungen der Kapillare im Lauf der Zeit zurückzuführen sein. Verwenden Sie eine andere Allelleiter-Injektion. Verwenden Sie nie die erste Injektion eines Laufes für die Auftrennung der Allelleiter.
	Die Basenpaarlänge von Allelen war inkorrekt, weil dem internen Längenstandard falsche Fragmentlängen zugeordnet wurden. Bestätigen Sie, dass die Fragmentlängen des internen Längenstandards richtig zugeordnet werden. Analysieren Sie die Probe erneut mit der GeneScan® Software und definieren Sie die internen Längenstandardfragmente erneut.

8. Literaturangaben

1. Edwards, A. *et al.* (1991) DNA typing with trimeric and tetrameric tandem repeats: Polymorphic loci, detection systems, and population genetics. In: *The Second International Symposium on Human Identification 1991*, Promega Corporation, 31–52.
2. Edwards, A. *et al.* (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* **49**, 746–56.
3. Edwards, A. *et al.* (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* **12**, 241–53.
4. Warne, D. *et al.* (1991) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human β-actin related pseudogene 2 (actbp2) detected using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6980.
5. Ausubel, F.M. *et al.* (1996) Unit 15: The polymerase chain reaction. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, John Wiley and Sons, NY.
6. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Chapter 14: In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
7. *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (1989) Erlich, H.A., ed., Stockton Press, New York, NY.
8. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (1990) Innis, M.A. *et al.*, eds., Academic Press, San Diego, CA.
9. Butler, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, London.
10. Presley, L.A. *et al.* (1992) The implementation of the polymerase chain reaction (PCR) HLA DQ alpha typing by the FBI laboratory. In: *The Third International Symposium on Human Identification 1992*, Promega Corporation, 245–69.
11. Hartmann, J.M. *et al.* (1991) Guidelines for a quality assurance program for DNA analysis. *Crime Laboratory Digest* **18**, 44–75.
12. *Internal Validation of STR Systems Reference Manual* #GE053, Promega Corporation.
13. Kline, M.C. *et al.* (2005) Results from the NIST 2004 DNA quantitation study. *J. Forensic Sci.* **50**, 571-8.
14. Levinson, G. and Gutman, G.A. (1987) Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 203-21.
15. Schlotterer, C. and Tautz, D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic. Acids Res.* **20**, 211-5.
16. Smith, J.R. *et al.* (1995) Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by *Taq* DNA polymerase. *Genome Res.* **5**, 312-7.
17. Magnuson, V.L. *et al.* (1996) Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by *Taq* DNA polymerase: Implications for PCR-based genotyping. *BioTechniques* **21**, 700–9.
18. Walsh, P.S., Fildes, N.J. and Reynolds, R. (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic. Acids Res.* **24**, 2807-12.
19. Griffiths, R. *et al.* (1998) New reference allelic ladders to improve allelic designation in a multiplex STR system. *Int. J. Legal Med.* **111**, 267-72.
20. Butler, J.M. (2006) Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. *J. Forensic Sci.* **51**, 253-65.
21. Hill, C.R. *et al.* (2008) Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples. *J. Forensic Sci.* **53**, 73-80.
22. Bär, W. *et al.* (1997) DNA recommendations: Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int. J. Legal Med.* **110**, 175-6.

23. Gill, P. *et al.* (1997) Considerations from the European DNA Profiling Group (EDNAP) concerning STR nomenclature. *Forensic Sci. Int.* **87**, 185–92.

24. Frégeau, C.J. *et al.* (1995) Characterization of human lymphoid cell lines GM9947 and GM9948 as intra- and interlaboratory reference standards for DNA typing. *Genomics* **28**, 184-97.

25. Mandrekar, P.V., Krenke, B.E. and Tereba, A. (2001) DNA IQ™: The intelligent way to purify DNA. *Profiles in DNA* **4**(3), 16.

26. Krenke, B.E. *et al.* (2005) Development of a novel, fluorescent, two-primer approach to quantitative PCR. *Profiles in DNA* **8**(1), 3–5.

27. Greenspoon, S. and Ban, J. (2002) Robotic extraction of sexual assault samples using the Biomek® 2000 and the DNA IQ™ System. *Profiles in DNA* **5**(1), 3–5.

28. McLaren, B., Bjerke, M. and Tereba, A. (2006) Automating the DNA IQ™ System on the Biomek® 3000 Laboratory Automation Workstation. *Profiles in DNA* **9**(1), 11-13.

29. Cowan, C. (2006) The DNA IQ™ System on the Tecan Freedom EVO® 100. *Profiles in DNA* **9**(1), 8-10.

30. Bjerke, M. *et al.* (2006) Forensic application of the Maxwell™ 16 Instrument. *Profiles in DNA* **9**(1), 3–5.

31. Mandrekar, P. *et al.* (2010) Improved performance of the Maxwell® 16 low elution volume system for forensic casework. *Profiles in DNA* **13(2)**. This can be viewed online at: **www.promega.com/profiles/1302/1302_05.html**

Weitere Literatur zu STR kann auf **www.promega.com/geneticidentity/** gefunden werden.

9. Anhang

9.A. Vorteile bei der Verwendung der Loci im PowerPlex® ESX 17 System

Die Loci im PowerPlex® ESX 17 System (Tabelle 2 und 3) wurden gewählt, weil sie den Empfehlungen des European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) entsprechen. Das PowerPlex® ESX 17 System amplifiziert alle von ENFSI empfohlenen Loci und SE33 in nur einer Reaktion. In Tabelle 4 sind die Allele vom PowerPlex® ESX 17 System aufgeführt, wie Sie in den 9947A und 9948 Kontroll-DNAs vorkommen.

Die terminale Addition von Nukleotiden (16,17) findet statt, wenn die *Taq* DNA Polymerase ein Nukleotid, im Allgemeinen Adenin, an die 3´-Enden amplifizierter DNA-Fragmente anfügt. Dies ist vom Template unabhängig. Die Effizienz, mit der die Addition auftritt, ändert sich mit verschiedenen Primer-Sequenzen. Daher kann manchmal eine Artefaktbande gesehen werden, die eine Base kürzer ist als erwartet (d. h. eine terminale Base fehlt). Wir haben die Primer-Sequenzen modifiziert und zu den Amplifikationsprotokollen einen finalen 45-minütigen Verlängerungsschritt bei 60 °C (18) hinzugefügt. So sollte die terminale Addition von Nukleotiden möglichst vollständig sein, wenn die empfohlenen Mengen an Template-DNA verwendet werden.

Tabelle 2. Das PowerPlex® ESX 17 System - Locus-spezifische Informationen.

STR-Locus	Kennzeichnung	Chromosomen-Position[1]	Repeat-Sequenz[2] 5´→ 3´
D18S51	Fluorescein	18q21.33 (59,1 Mb)	AGAA (19)
D21S11	Fluorescein	21q21.1 (19,476 Mb)	TCTA Komplex (19)
TH01	Fluorescein	11p15.5 (2,149 Mb)	AATG (19)
D3S1358	Fluorescein	3p21.31 (45,557 Mb)	TCTA Komplex
Amelogenin[3]	Fluorescein	Xp22,1–22.3 und Y	NA
D16S539	JOE	16q24.1 (84,944 Mb)	GATA
D2S1338	JOE	2q35 (218,705Mb)	TGCC/TTCC
D1S1656	JOE	1q42 (228,972 Mb)	TAGA Komplex
D10S1248	JOE	10q26.3 (130,567Mb)	GGAA
FGA	TMR-ET	4q28 (155,866Mb)	TTTC Komplex (19)
D8S1179	TMR-ET	8q24.13 (125,976Mb)	TCTA Komplex (19)
vWA	TMR-ET	12p13.31 (5,963Mb)	TCTA Komplex (19)
D22S1045	TMR-ET	22q12.3 (35,779Mb)	ATT
SE33	CXR-ET	6q14 (89,043 Mb)	AAAG Komplex
D19S433	CXR-ET	19q12 (35,109 Mb)	AAGG Komplex
D12S391	CXR-ET	12p12 (12,341 Mb)	AGAT/AGAC Komplex
D2S441	CXR-ET	2p14 (68,214Mb)	TCTA

[1] Informationen über die Chromosomenposition dieser Loci können in Referenz 20 und 21 und unter: **www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/chrom.htm** gefunden werden.

[2] Im Bericht vom August 1997 (22,23) der DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics (ISFH) wird erwähnt: „1) for STR loci within coding genes, the coding strand shall be used and the repeat sequence motif defined using the first possible 5´ nucleotide of a repeat motif; and 2) for STR loci not associated with a coding gene, the first database entry or original literature description shall be used".

[3] Amelogenin ist kein STR, weist jedoch eine 87 bp X-spezifische Bande und eine 93 bp Y-spezifische Bande auf. 9947A DNA (weiblich) weist nur die 87 bp X-spezifische Bande auf.

Tabelle 3. PowerPlex® ESX 17 System, Informationen zur Allelleiter.

STR-Locus	Kenn-zeichnung	Längenbereich von Allelleiter-Komponenten[1,2] (Basen)	Repeat-Zahlen von Allelleiter-Komponenten[3]
D18S51	Fluorescein	286–366	7–10, 10.2, 11–13, 13.2, 14–27
D21S11	Fluorescein	203–259	24, 24,2, 25, 25,2, 26–28, 28,2, 29, 29,2, 30, 30,2, 31, 31,2, 32, 32,2, 33, 33,2, 34, 34,2, 35, 35,2, 36–38
TH01	Fluorescein	152–195	3–9, 9,3, 10–11, 13,3
D3S1358	Fluorescein	103–147	9–20
Amelogenin[4]	Fluorescein	87, 93	X, Y
D16S539	JOE	273–321	4–16
D2S1338	JOE	197–269	10, 12, 14–28
D1S1656	JOE	137–184	9–14, 14,3, 15, 15,3, 16, 16,3, 17, 17,3, 18, 18,3, 19, 19,3, 20,3
D10S1248	JOE	83–127	8–19
FGA	TMR-ET	264–410	14–18, 18,2, 19, 19,2, 20, 20,2, 21, 21,2, 22, 22,2, 23, 23,2, 24, 24,2, 25, 25,2, 26–30, 31,2, 32,2, 33,2, 42,2, 43,2, 44,2, 45,2, 46,2, 48,2, 50,2
D8S1179	TMR-ET	203–251	7–19
vWA	TMR-ET	124–180	10–24
D22S1045	TMR-ET	79–118	7–20
SE33	CXR-ET	267–417	4,2, 6,3, 8–20, 20,2, 21, 21,2, 22, 22,2, 23,2, 24,2, 25,2, 26,2, 27,2, 28,2, 29,2, 30,2, 31,2, 32,2, 33,2, 34,2, 35–37, 39, 42
D19S433	CXR-ET	193–245	5,2, 6,2, 8–12, 12,2, 13, 13,2, 14, 14,2, 15, 15,2, 16, 16,2, 17, 17,2, 18, 18,2
D12S391	CXR-ET	130–182	14–17, 17,3, 18, 18,3, 19–27
D2S441	CXR-ET	88–124	8–11, 11.3, 12–17

[1] Die Länge jedes Allels in der Allelleiter wurde durch Sequenzanalysen bestätigt.

[2] Wenn ein interner Längenstandard, wie der CC5 Internal Lane Standard 500, verwendet wird, können sich die berechneten Längen der Allelleiter-Komponenten von den hier aufgeführten unterscheiden. Verschiedene Sequenzen in der Allelleiter- und den ILS-Fragmenten können Unterschiede im Wanderungsverhalten bewirken. Die Fluoreszenzmarkierung wirkt sich ebenfalls auf das Wanderungsverhalten der Allele aus.

[3] Eine aktuelle Liste der Mikrovarianten ist im Variant Allele Report, veröffentlicht am U.S. National Institute of Standards and Technology (NIST), zu finden. Website:
www.cstl.nist.gov/div831/strbase/

[4] Amelogenin ist kein STR, weist jedoch eine 87 bp X-spezifische Bande und eine 93 bp Y-spezifische Bande auf. 9947A DNA (weiblich) weist nur die 87 bp X-spezifische Bande auf.

Tabelle 4. PowerPlex® ESX 17 System, Allelbenennungen in allgemein erhältlichen Standard DNA Templates.

	Standard DNA Templates[1]		
STR-Locus	**9947A**	**9948**	**2800M**
D18S51	15, 19	15, 18	16, 18
D21S11	30, 30	29, 30	29, 31.2
TH01	8, 9.3	6, 9.3	6, 9.3
D3S1358	14, 15	15, 17	17, 18
Amelogenin	X, X	X, Y	X, Y
D16S539	11, 12	11, 11	9, 13
D2S1338	19, 23	23, 23	22, 25
D1S1656	18.3, 18.3	14, 17	12, 13
D10S1248	13, 15	12, 15	13, 15
FGA	23, 24	24, 26	20, 23
D8S1179	13, 13	12, 13	14, 15
vWA	17, 18	17, 17	16, 19
D22S1045	11, 14	16, 18	16, 16
SE33	19, 29.2	23.2, 26.2	15, 16
D19S433	14, 15	13, 14	13, 14
D12S391	18, 20	18, 24	18, 23
D2S441	10, 14	11, 12	10, 14

[1] Informationen über Strain 9947A und 9948 können online aufgerufen werden:
http://ccr.coriell.org/Sections/Collections/NIGMS/?SsId=8
Information über die Verwendung von 9947A und 9948 DNA als Standard-DNA-Template können in Literaturangabe 24 gefunden werden.

9.B. Methoden zur DNA-Extraktion und -Quantifizierung

Das DNA IQ™ System (Bestellnummer DC6700) ist ein System zur DNA-Isolierung und -Quantifizierung, das speziell für Spurenmaterial und Vaterschaftsproben konzipiert ist (25). Dieses System verwendet paramagnetische Partikel für die einfache und effiziente Aufreinigung von DNA-Proben für die STR-Analyse. Es kann dazu verwendet werden, DNA aus Spuren oder flüssigen Proben, wie Blut, zu extrahieren. Das DNA IQ™ Resin eliminiert PCR-Inhibitoren und Verunreinigungen, die häufig in Spurenmaterial zu finden sind. Mit DNA-reichen Proben liefert das DNA IQ™ System eine konstante Menge an Gesamt-DNA. Das System wird dazu verwendet, DNA aus Routine-Proben, einschließlich Mundhöhlenabstrich, FTA® Papier oder flüssigem Blut zu isolieren und zu quantifizieren. Zusätzlich kann man damit auch DNA aus Spurenmaterial, Gewebeproben, differentiell getrennten Proben von sexuellen Übergriffen und Spuren auf Trägermaterialien isolieren. Das DNA IQ™ System wurde mit den PowerPlex® Systemen getestet, um ein optimiertes Verfahren zu gewährleisten. Siehe Kapitel 9.F für Bestellinformationen.

Für Anwendungen, die menschenspezifische DNA-Quantifizierung erfordern, wurde das Plexor® HY System (Bestellnummer DC1000) entwickelt (26). Siehe Kapitel 9.F für Bestellinformationen.

Das DNA IQ™ System wurde auf der Beckman Coulter Biomek® 2000 Laboratory Automation Workstation (27), Biomek® 3000 Laboratory Automation Workstation (28) und dem Tecan Freedom EVO® Liquid Handler (29) vollständig automatisiert. Zusätzlich sind das DNA IQ™ Reference Sample Kit für Maxwell® 16 (Bestellnummer AS1040) und DNA IQ™ Casework Pro Kit für Maxwell® 16 (Bestellnummer AS1240) erhältlich (30,31). Wenden Sie sich für Informationen über die Automatisierung von Laborverfahren auf automatisierten Workstations an Ihre zuständige Promega-Niederlassung oder Vertriebsstelle (Kontaktinformationen sind erhältlich unter: **www.promega.com/worldwide/**) oder E-Mail an: **genetic@promega.com**

9.C. Der CC5 Internal Lane Standard 500

Der CC5 Internal Lane Standard 500 enthält 21 DNA Fragmente von 60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 und 500 Basen Länge (Abbildung 25). Jedes Fragment ist mit CC5-Farbstoff markiert und kann zusammen mit PowerPlex® ESX 17 PCR-Produkten aufgetrennt (als fünfte Farbe) werden. Der CC5 ILS 500 wurde für die Verwendung in jeder CE-Injektion konzipiert, um die Präzision der PowerPlex® ESX 17 System-Analyse zu erhöhen. Protokolle zu Vorbereitung und Gebrauch dieses internen Längenstandards sind in Abschnitt 5 zu finden.

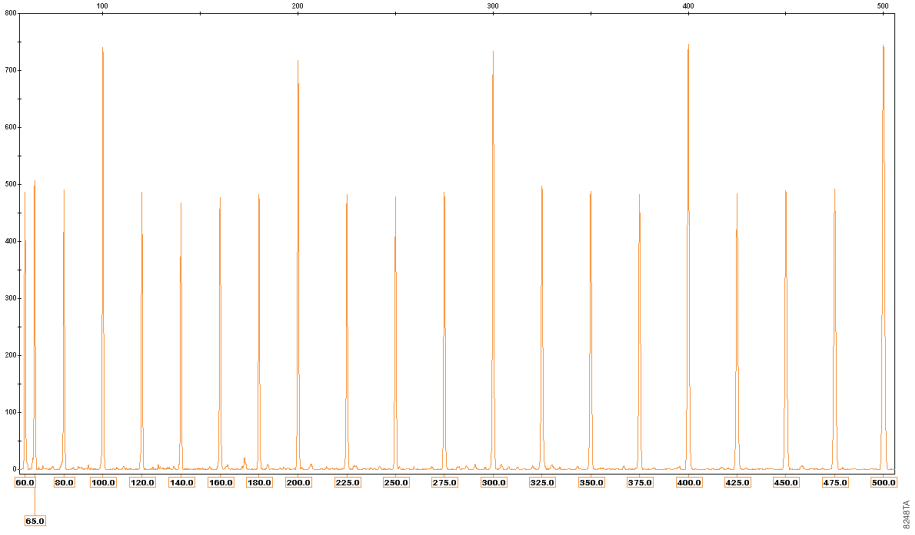

Abbildung 25. CC5 Internal Lane Standard 500. Das Elektropherogramm zeigt die Fragmente des CC5 Internal Lane Standard 500 **.**

9.D. Vorbereitung des PowerPlex® ESX 17 System Amplification Mix

Ein Arbeitsblatt zur Berechnung der erforderlichen Menge jeder Komponente des PCR-Amplifikationsgemisches wird in Tabelle 5 zur Verfügung gestellt. Multiplizieren Sie das Volumen (µl) pro Reaktion mit der Gesamtzahl der Reaktionen, um das endgültige Master Mix Volumen (µl) zu bestimmen.

Tabelle 5. PCR Amplifikationsgemisch für das PowerPlex® ESX 17 System.

Komponente des PCR Amplifikationsgemisches	Volumen pro Reaktion	x	Anzahl der Reaktionen	=	Endvolumen (µl)
Wasser, Amplifikationsgüte[1]	µl	x		=	
PowerPlex® ESX 5X Master Mix	5,0 µl	x		=	
PowerPlex® ESX 17 10X Primer Pair Mix	2,5 µl	x		=	
Pro Röhrchen					
Template-DNA Volumen[1] (0,25–0,5 ng)	bis zu 17,5 µl	x		=	
Gesamt-Reaktionsvolumen	25 µl	x		=	

[1] Das Master Mix-Volumen and Template DNA-Volumen müssen insgesamt 25 µl ergeben. Berücksichtigen Sie das Volumen der Template-DNA und fügen Sie Wasser in Amplifikationsgüte hinzu, bis das endgültige Reaktionsvolumen von 25 µl erreicht ist.

9.E. Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

TE^{-4} Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA [pH 8,0])

1,21 g Tris base
0,037 g EDTA ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$)

Tris-Base und EDTA in 900 ml entionisiertem Wasser lösen. Stellen Sie mittels HCl den pH-Wert auf 8,0 ein. Bringen Sie das Gesamtvolumen mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter.

9.F. Verwandte Produkte

STR Fluoreszenz-Systeme

Produkt	Größe	Bestell-nummer
PowerPlex® ESX 16 System	100 Reaktionen	DC6721
	400 Reaktionen	DC6710
PowerPlex® ESI 16 System	100 Reaktionen	DC6771
	400 Reaktionen	DC6770
PowerPlex® ESI 17 System	100 Reaktionen	DC6781
	400 Reaktionen	DC6780
PowerPlex® 16 Monoplex System, Penta E (Fluorescein)	100 Reaktionen	DC6591
PowerPlex® 16 Monoplex System, Penta D (JOE)	100 Reaktionen	DC6651
PowerPlex® ES Monoplex System, SE33 (JOE)	100 Reaktionen	DC6751
PowerPlex® 18D System	200 Reaktionen	DC1802
	800 Reaktionen	DC1808
PowerPlex® 16 HS System	100 Reaktionen	DC2101
	400 Reaktionen	DC2100
PowerPlex® 16 System	100 Reaktionen	DC6531
	400 Reaktionen	DC6530
PowerPlex® S5 System	100 Reaktionen	DC6951
	400 Reaktionen	DC6950
PowerPlex® ES System	100 Reaktionen	DC6731
	400 Reaktionen	DC6730
PowerPlex® CS7 System, Custom	100 Reaktionen	X6613
PowerPlex® Y23 System	50 Reaktionen	DC2305
	200 Reaktionen	DC2320

Nicht für die medizinische Diagnostik.

Zubehörkomponenten

Produkt	Größe	Bestell-nummer
PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 310*	50 µl (jeder Farbstoff)	DG4600
PowerPlex® 5-Dye Matrix Standards, 3100/3130*	25 µl (jeder Farbstoff)	DG4700
PowerPlex® Direct Amp Reagent, Custom*	2 × 1 ml	X7221X
	8 ml	X7271X
CC5 Internal Lane Standard 500	300 µl	DG1521
Wasser, Amplifikationsgüte	6 250 µl (5 × 1 250 µl)	DW0991

* Nicht für die medizinische Diagnostik.

9.F. Verwandte Produkte (Fortsetzung)

System für die Probenvorbereitung

Produkt	Größe	Bestell-nummer
DNA IQ™ System	100 Reaktionen	DC6701
	400 Reaktionen	DC6700
Differex™ System*	50 Proben	DC6801
	200 Proben	DC6800
Tissue and Hair Extraction Kit (mit dem DNA IQ™ zu verwenden)	100 Reaktionen	DC6740
Maxwell® 16 Forensic Instrument	jede	AS3060
DNA IQ™ Reference Sample Kit für Maxwell® 16**	48 Präp.	AS1040
DNA IQ™ Casework Pro Kit für Maxwell® 16*	48 Präp.	AS1240
Plexor® HY System*	800 Reaktionen	DC1000
	200 Reaktionen	DC1001
Slicprep™ 96 Device	10er-Pack	V1391

* Nicht für die medizinische Diagnostik.
** Nur für den Laborgebrauch. Nicht für den diagnostische Einsatz.

ART® Gegen Aerosol geschützte Pipettenspitzen

Produkt	Volumen	Größe (Spitzen/Packung)	Bestell-nummer
ART® 10 Ultramicro Pipet Tip	0,5–10 µl	960	DY1051
ART® 20E Ultramicro Pipet Tip	0,5–10 µl	960	DY1061
ART® 20P Pipet Tip	20 µl	960	DY1071
ART® GEL Gel Loading Pipet Tip	100 µl	960	DY1081
ART® 100 Pipet Tip	100 µl	960	DY1101
ART® 100E Pipet Tip	100 µl	960	DY1111
ART® 200 Pipet Tip	200 µl	960	DY1121
ART® 1000E Pipet Tip	1 000 µl	800	DY1131

[a] U.S. Patent Nr. 6,242,235, das australische Patent Nr. 761757, das kanadische Patent Nr. 2,335,153, das chinesische Patent Nr. ZL99808861.7, das Hong Kong-Patent Nr. HK 1040262, das japanische Patent Nr. 3673175, das europäische Patent Nr. 1088060 und andere Patente wurden eingereicht.

[b] U.S. Patent Nr. 5,843,660, 6,479,235, 6,221,598 und 7,008,771, das australische Patent Nr. 724531, das kanadische Patent Nr. 2,118,048, das europäische Patent Nr. 0960207, das chinesische Patent Nr. ZL99813729.4 und ZL9719, das koreanische Patent Nr. 290332, das Singapur-Patent Nr. 57050, das japanische Patent Nr. 3602142 und 4034293 und andere Patente wurden eingereicht.

[c] STR-Loci unterliegen U.S. Patenten. Nr. RE 37,984, des deutschen Patents Nr. DE 38 34 636 C2 und anderer Patente, die der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften, e.V., Deutschland, erteilt wurden. Die Entwicklung und Verwendung von STR-Loci unterliegt U.S. Patenten Nr. 5,364,759, dem australischen Patent Nr. 670231 und andere beantragte Patente, die dem Baylor College of Medicine, Houston, Texas, zugewiesen wurden.

[d] Lizenziert unter U.S. Patent Nr. 5,338,671 und 5,587,287 und entsprechenden Patenten in anderen Ländern. Nur für den Laborgebrauch. Nicht für den diagnostische Einsatz.

[e] Allelsequenzen für eines oder mehrere der Loci vWA, FGA, D8S1179, D21S11 und D18S51 in Allelleitergemischen unterliegen U.S. Patenten Nr. 7,087,380, dem australischen Patent Nr. 2003200444 und entsprechenden Patentanträgen außerhalb der USA.

[f] Die Filter TMR-ET, CXR-ET und CC5 sind proprietär.

[h] Dieses Produkt oder Teile davon wird unter der Lizenz der GE Healthcare unter den folgenden Patenten hergestellt und vertrieben: Österreichisches Patent Nr. E236994, australisches Patent Nr. 692230, belgisches Patent Nr. 0743987, Schweizer Patent Nr. 0743987 und 0851867, deutsches Patent Nr. 19581489, 69530286.8 und 0851867, EP-Patent Nr. 0743987 und 0851867, spanisches Patent Nr. 2197193 und 2173310, französisches Patent Nr. 0743987 und 0851867, britisches Patent Nr. 0743987 und 0851867, italienisches Patent Nr. 0743987 und 0851867, Liechtenstein-Patent Nr. 0743987 und 0851867, niederländisches Patent Nr. 0743987 und 0851867, schwedisches Patent Nr. 0743987 und 0851867, U.S. Patent Nr. 5,654,419, 5,688,648, 5,869,255, 6,177,247, 5,707,804, 6,028,190, 6,544,744, 7,015,000 und 5,728,528, kanadisches Patent Nr. 2231475, japanisches Patent Nr. 3066984 und andere eingereichte oder Nicht-US- Patentanträge.

Promega

(h) **Allgemeine Geschäftsbedingungen für den Endverbraucher**

Zustimmung. Diese allgemeinen Geschäftsbedingungen sind für den Kauf, Gebrauch und die Akzeptanz der Produkte maßgeblich, die im Bestellformular, dem Angebot oder der Rechnung aufgeführt sind, wobei diese Produkte von Promega an den Käufer/Übernehmer („Endverbraucher“) solcher Produkte verkauft und vertrieben werden. Die Übergabe/der Verkauf von Produkten an den Endverbraucher hängt ausdrücklich von der Zustimmung des Endverbrauchers zu diesen allgemeinen Geschäftsbedingungen ab.

Einschränkung des Gebrauchs. Endverbraucher sind ausdrücklich nicht dazu berechtigt und es ist ihnen untersagt, derartige Produkte weiter zu verkaufen, zu übergeben oder zu vertreiben, weder als Einzelprodukt noch als Komponente eines anderen Produkts. Das Recht, diese Produkte zu verwenden, umfasst oder beinhaltet an und für sich kein Recht des Endverbrauchers auf die Technologie oder das geistige Eigentum von GE Healthcare Bio-Sciences Corp., wenn hierin nicht ausdrücklich vorgesehen. Der Endverbraucher darf keine Sequenz(en) dazu verwenden, um die Parameter von proprietären Produkten oder Services der GE Healthcare Bio-Sciences Corp. zurückzuentwickeln.

Gewährleistungsausschluss. GE Healthcare Bio-sciences Corp. bietet dem Endverbraucher keine Gewährleistungen (gesetzlich oder konkludent) einschließlich, ohne Einschränkung, bezüglich der Qualität, des Zustands, der Beschreibung, der Marktgängigkeit oder der Eignung des Produkts zu einem bestimmten Zweck, und alle derartigen Gewährleistungen werden hiermit ausdrücklich ausgeschlossen. GE Healthcare Bio-Sciences Corp. schließt hiermit ausdrücklich jede Gewährleistung bezüglich der Ergebnisse aus, die durch den Gebrauch der Produkte erzielt werden, einschließlich, ohne Einschränkung, alle Forderungen aufgrund inakkurater, ungültiger oder unvollständiger Ergebnisse.

Haftungsausschluss. GE Healthcare Bio-Sciences Corp. und seine Tochtergesellschaften übernehmen keine Haftung gegenüber dem Endverbraucher, einschließlich, ohne Einschränkung, für Gebrauchs- oder Profitverlust, Geschäftsunterbrechung oder beliebige Folgeschäden, Nebenschäden oder besondere Schäden oder sonstige mittelbare Schäden beliebiger Art, gleichgültig wie verursacht und gleichgültig, ob eine Vertragshandlung, eine unerlaubte Handlung, Kausalhaftung oder eine andere Rechtsgrundlage vorliegt.

© 2009, 2011, 2012 Promega Corporation. Alle Rechte vorbehalten.

Maxwell, Plexor und PowerPlex sind eingetragene Warenzeichen der Promega Corporation. Differex, DNA IQ, PowerTyper und Slicprep sind Warenzeichen der Promega Corporation.

ABI PRISM, GeneMapper, GeneScan, Genotyper und MicroAmp sind eingetragene Warenzeichen der Applera Corporation. ART ist ein eingetragenes Warenzeichen von Molecular Bio-Products, Inc. Biomek ist ein eingetragenes Warenzeichen der Beckman Coulter, Inc. Freedom EVO ist ein eingetragenes Warenzeichen der Tecan AG Corporation. FTA ist ein eingetragenes Warenzeichen von Flinders Technologies, Pty, Ltd. und ist an Whatman lizenziert. GeneAmp ist ein eingetragenes Warenzeichen von Roche Molecular Systems, Inc. Hi-Di and POP-4 sind eingetragene Warenzeichen der Applera Corporation. Macintosh ist ein eingetragenes Warenzeichen der Apple Computer, Inc. Microsoft, Windows und Windows NT sind eingetragene Warenzeichen der Microsoft Corporation.

Produkte können unter beantragte oder bereits erteilte Patente fallen oder bestimmten Auflagen unterliegen. Nähere Informationen entnehmen Sie bitte unserer Website.

Alle Preise und Spezifikationen können ohne vorherige Ankündigung geändert werden.

Änderung von Produktansprüchen vorbehalten. Bitte wenden Sie sich an den Technischen Kundendienst von Promega oder greifen Sie auf den Promega-Onlinekatalog zu, um die neuesten Informationen über Promega-Produkte zu erhalten.

Promega Corporation • 2800 Woods Hollow Road
Madison, WI 53711-5399 USA • Phone 608-274-4330

Promega

www.promega.com